

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV**

**MATHEUS NASCIMENTO DE AGUIAR**

**Transformação genética de plantas *in vitro* de *Arachis* spp.  
via *Agrobacterium rhizogenes***

**BRASÍLIA - DF**  
**2023**

MATHEUS NASCIMENTO DE AGUIAR

**Transformação genética de plantas in vitro de *Arachis* spp.  
via *Agrobacterium rhizogenes***

Trabalho de conclusão de curso apresentada à  
Banca Examinadora da Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária como  
exigência final para obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Souza Vilela  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Miranda  
Brasileiro

**BRASÍLIA - DF  
2023**

## **Transformação genética de plantas in vitro de *Arachis* spp. via *Agrobacterium rhizogenes***

MATHEUS NASCIMENTO DE AGUIAR

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO AGRÔNOMO.

**APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 15/02/2023**

BANCA EXAMINADORA

*Michelle S. Vilela*

MICHELLE SOUZA VILELA, Dr<sup>a</sup>. Universidade de Brasília  
Professora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB  
(ORIENTADORA) e-mail: michellevilelaunb@gmail.com

*Nara Oliveira Silva Souza*

NARA OLIVEIRA SILVA SOUZA, Dr<sup>a</sup>. Universidade Federal de Lavras  
Professora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB  
(EXAMINADORA) e-mail: narasouza@unb.br

*Cristiano Castro Lacorte*

CRISTIANO CASTRO LACORTE, Dr. Wageningen University and Research Centre  
Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
(EXAMINADOR) e-mail: cristiano.lacorte@embrapa.br

BRASÍLIA – DF  
Fevereiro/2023

À Andressa Martins, minha “chefinha”, que acreditou no meu potencial quando eu mesmo não consegui acreditar e me incentivou a seguir com este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade de Brasília, seu corpo docente, direção e administração que mesmo no momento mais sombrio da nossa história recente, diante de uma pandemia e em meio ao desmantelamento e precarização do ensino público no país, se manteve firme desenvolvendo ensino, pesquisa e extensão enquanto era acusada de promover balbúrdia.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização da infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Souza Vilela pela paciência e por aceitar dar a orientação deste trabalho eu não seria desenvolvido diretamente com ela.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Miranda Brasileiro pela confiança, disponibilização da bolsa de iniciação científica, pelas orientações, conselhos e incentivos ao longo desses quatro anos que trabalhei com ela e pelos próximos que virão no mestrado.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga III (LPP-III) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio constante, pela parceria e por tornarem o dia-a-dia no laboratório menos estressante. Em especial as minhas “chefes” Andressa Martins e Bruna Medeiros que me ensinaram praticamente tudo o que eu sei sobre o trabalho que desempenho hoje em dia.

Aos meus amigos do grupo de RPG pela compreensão quando tive que desmarcar várias sessões seguidas enquanto elaborava a escrita deste trabalho.

À minha irmã Nathália Aguiar que está sempre do meu lado, sempre me apoiando, nos momentos bons e ruins.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À Alexandra Elbakyan, criadora do Sci-Hub, pela coragem de lutar contra o sistema que explora comercialmente nossas produções científicas sem jamais ter participado delas e por proporcionar a acessibilidade gratuita a qualquer artigo científico através desse site que foi essencial para a construção deste e de tantos outros trabalhos acadêmicos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado.

## RESUMO

O grupo de pesquisa “genômica de *Arachis*” da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem estudando ao longo dos últimos anos a resposta transcricional de genes associados à resistência a estresses bióticos e abióticos em duas espécies silvestres de amendoim, *Arachis stenosperma* e *Arachis duranensis*. Um desses genes é a Estibeno Sintase (STS), enzima catalizadora da última etapa de biossíntese do resveratrol que é uma fitoalexina envolvida na resposta da planta a diferentes tipos de estresses e tem propriedades antioxidantes que são de grande interesse para a indústria farmacêutica e de cosméticos. Entretanto, as tecnologias atuais de extração e produção de resveratrol com alto grau de pureza utilizando diferentes tipos de extratos naturais de videira (*Vitis* spp.) e de *Polygonum* spp. ainda são pouco eficientes. Assim, devido à demanda mundial pelo resveratrol ter aumentado consideravelmente nos últimos anos, sua oferta atual é insuficiente para suprir o mercado. Neste contexto, torna-se estratégico buscar novas fontes naturais de resveratrol como, por exemplo, pelo cultivo *in vitro* de raízes transgênicas do tipo “hairy root” de espécies cultivadas e silvestres de amendoim. Assim, o presente trabalho se propõe a estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* raízes transgênicas do tipo “hairy root” a partir da transformação via *Agrobacterium rhizogenes* do amendoim cultivado, *A. hypogaea*, e da espécie silvestre *A. stenosperma*. Para tanto, foram avaliados: a melhor forma de esterização das sementes, transformação via duas linhagens de *A. rhizogenes* em folhas destacadas de *Arachis* spp. Ao final deste trabalho foram estabelecidas as bases de um protocolo de transformação genética e cultivo de raízes transgênicas de amendoim cultivado e silvestre, mas que ainda é necessário se fazer melhorias para torná-lo mais eficiente.

PALAVRAS CHAVE: Resveratrol, *Arachis*, “hairy root”, *Agrobacterium rhizogenes*

## ABSTRACT

The “*Arachis* genomics” research group at Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia over the last few years has been studying the transcriptional response of genes associated with resistance to biotic and abiotic stresses in two wild peanut species, *Arachis stenosperma* and *Arachis duranensis*. One of these genes is Stilbene Synthase (STS), an enzyme that catalyzes the last stage of resveratrol biosynthesis, which is a phytoalexin involved in the plant's response to different types of stress and has antioxidant properties that are of great interest to the pharmaceutical and cosmetics industry. However, current technologies for the extraction and production of resveratrol with a high degree of purity using different types of natural extracts from vine (*Vitis* spp.) and *Polygonum* spp. are still inefficient. Thus, due to the worldwide demand for resveratrol having increased considerably in recent years, its current offer is insufficient to supply the market. In this context, it becomes strategic to seek new natural sources of resveratrol, such as, for example, the *in vitro* cultivation of transgenic roots of the “hairy root” type of cultivated and wild peanut species. Thus, the present study proposes to establish a protocol for the *in vitro* cultivation of transgenic roots of the “hairy root” type from the transformation via *Agrobacterium rhizogenes* of the cultivated peanut, *A. hypogaea*, and the wild species *A. stenosperma*. For this purpose, the following were evaluated: the best form of esterization of the seeds, transformation via two strains of *A. rhizogenes* in detached leaves of *Arachis* spp. At the end of this study, the bases of a protocol for genetic transformation of cultivated and wild peanut transgenic roots were established, but it is still necessary to make improvements to make it more efficient.

KEY WORDS: Resveratrol, *Arachis*, “hairy root”, *Agrobacterium rhizogenes*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama da infecção natural e transformação de plantas in vitro via *Agrobacterium tumefaciens*. Fonte: Guo et al. 2019 ..... 13
- Figura 2:** Mapas dos vetores **(A)** pPZP-BAR-AdSTS1 e **(B)** pPZP-BAR-AsSTS2 ... 16
- Figura 3:** Processo de esterilização das sementes de amendoim, passando pelas etapas de **(A)** lavagem na água com detergente, **(B)** incubação no hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), **(C)** enxague em água estéril, **(D)** retirada da testa e **(E)** semeadura no meio de germinação..... 17
- Figura 4:** **(A)** Semente de *A. stenosperma* que foi esterilizada com hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 5 minutos apresentando contaminação fúngica e **(B)** plântula germinando livre de contaminações cuja semente foi esterilizada com hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 10 minutos. Plântula de *Arachis hypogaea* crescendo em **(C)** meio MS1X e em **(D)** MS0,5X.. ..... 20
- Figura 5:** **(A)** Linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* carregando o vetor pPZP-BAR-AsSTS2 sendo retirada do estoque glicérol. **(B)** Estriamento da cultura de bactéria em placa de Petri com meio LB semi-sólido contendo ágar bacteriológico a 1,6% (m/v) e os agentes seletivos estreptomicina 300 mg/L e canamicina 100 mg/L..... 21
- Figura 6:** **(A)** Placa de meio LB semi-sólido apresentando crescimento bacteriano após 48 horas de crescimento, **(B)** colônia isolada retirada para preparo do **(C)** pré-inóculo de 1 mL, **(D)** 100 µL do pré-inóculo diluídos em 100 mL de YEP líquido para preparo do inóculo e **(E)** concentrado de células bacterianas formado no fundo do tubo de ensaio após centrifugação..... 22
- Figura 7:** Leituras de  $A_{600}$  de inócuos da linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* carregando o vetor pPZP-BAR-AsSTS2 cultivados em **(A)** meio YEP líquido e **(B)** meio LB líquido. .... 23
- Figura 8:** **(A)** Folhas de *A. stenosperma* imersas na suspensão de *A. rhizogenes*, **(B)** são transferidas para meio de cocultivo e **(C)**, após dois dias, são transferidas para o meio MS1X semi-sólido com cefotaxima 250 mg/L. .... 24
- Figura 9:** Confirmação da transgenia das raízes do tipo HR por meio da observação da fluorescência da GFP. **(A)** e **(D)** Folhas destacadas visualizadas sob luz branca, **(B)** e **(E)** sob luz UV da lâmpada portátil e **(C)** em microscópio estereoscópio de fluorescência com luz UV a 395 nm. Escala = 0,5 cm. .... 25



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos .....	11
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
3.1 <i>Agrobacterium</i> spp.....	12
3.2 Aplicação biotecnológica de raízes do tipo HR induzidas pela infecção por <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	13
3.3 Metodologias de transformação de plantas <i>in vitro</i> de <i>Arachis hypogaea</i> via <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	14
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>15</b>
4.1. Material vegetal .....	15
4.2. Linhagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	15
4.3. Estabelecimento de um protocolo de esterilização de sementes de <i>Arachis</i> spp. ....	16
4.4. Estabelecimento de um protocolo de obtenção <i>in vitro</i> de raízes do tipo HR de <i>Arachis</i> spp.....	17
4.5. Análise de raízes do tipo HR de <i>Arachis</i> spp. ....	18
4.6. Estabelecimento de um protocolo de cultivo <i>in vitro</i> de raízes do tipo HR de <i>Arachis</i> spp.....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>19</b>
5.1 Esterilização das sementes de <i>Arachis</i> spp. ....	19
5.2 Obtenção de raízes do tipo HR de <i>Arachis</i> spp. ....	21
5.2.1 Cultivo das linhagens de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	21
5.2.2 Inoculação das folhas de <i>Arachis</i> spp. ....	23
5.2.3 Crescimento e análise de raízes do tipo HR de <i>Arachis</i> spp. ....	25
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>27</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O grupo de pesquisa genômica de *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem trabalhando ao longo dos últimos anos na exploração do pool genético das espécies silvestres do gênero *Arachis*, nativas do Brasil e países vizinhos, acumulando conhecimento, amplo acervo de dados genômicos e proficiência em várias ferramentas biotecnológicas para essas espécies (Guimarães et al. 2017). Estudos realizados pela equipe demonstraram que espécies silvestres de *Arachis* são capazes de sintetizar naturalmente níveis elevados de resveratrol e identificaram em seu genoma alguns dos genes que codificam a Estibeno Sintase (STS), enzima que catalisa a última etapa de biossíntese do resveratrol (Carvalho et al. 2017; Carvalho et al. 2019; Carvalho et al. 2020).

O resveratrol (3,5,4-tri-hidroxiestilbeno), é um polifenol natural encontrado em algumas plantas alimentícias, como frutas vermelhas e o amendoim, e que tem uma série de benefícios à saúde humana devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas entre outras (Zhang et al 2021). A produção natural de resveratrol, por meio da extração *in natura* de fontes naturais, como cascas e sementes de uva (*Vitis vinífera*) e de raízes da erva conhecida como knotweed japonês (*Polygonum cuspidatum*) (Thapa et al. 2019; Tian e Liu 2020), não é suficiente para atender a demanda crescente por esse insumo, cuja estimativa de mercado atual está na faixa de 50 milhões de dólares (Pezzuto 2019). O resveratrol também pode ser produzido por síntese química ou por microrganismos geneticamente modificados (GMs), contudo esses processos são complexos e de alto custo de produção, o que limita sua aplicação em escala industrial (Fan et al. 2010; Thapa et al. 2019).

Dentro deste contexto de demanda crescente e baixa oferta, torna-se estratégico buscar novas fontes naturais de resveratrol. Assim, a exploração de espécies silvestres de *Arachis* como fonte natural de bioprodução de resveratrol e o uso de genes STS isolados de *Arachis* para a engenharia de vias metabólicas em plantas transgênicas podem ser uma alternativa. Então o presente trabalho se estabelece como parte de um projeto do grupo *Arachis* baseado na exploração da biodiversidade brasileira por meio do cultivo de raízes transgênicas que tem como objetivo a extração e produção biotecnológica do resveratrol, de altíssimo valor agregado.

Para isso, é preciso se estabelecer uma metodologia pela qual será possível produzir e cultivar raízes transgênicas de *Arachis* spp. obtidas pela transformação genética mediada por linhagens selvagens de *Agrobacterium rhizogenes*. A transformação genética mediada por linhagens selvagens de *A. rhizogenes* induz naturalmente a formação de raízes-em-cabeleira ou HR (sigla do inglês “hairy root”), que apresentam alta taxa de crescimento e elevada ramificação radicular, sem necessidade de adição exógena de fitormônios (Mehrotra et al. 2015).

A equipe já tem uma metodologia bem estabelecida de transformação e cultivo *ex vitro* de raízes HR de *Arachis* spp. que é utilizada nos bioensaios com genes candidatos à resistência a nematoide das galhas (Guimaraes et al. 2017). Entretanto, para a extração, purificação e quantificação de metabólitos, como o resveratrol, é necessário que as raízes HR sejam cultivadas em condições axênicas, (*in vitro*), pois a produção de metabólitos secundários em raízes HR pode ser induzida por meio de elicitores em condições controladas e sustentáveis de cultura de tecidos (Halder et al. 2019). O presente trabalho se propõe a desenvolver uma metodologia de transformação e cultivo *in vitro* de raízes HR de espécies cultivadas e silvestres de *Arachis*, tomando como base os protocolos já descritos na literatura científica para o amendoim cultivado, *A. hypogaea*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um processo biotecnológico de transformação e cultivo *in vitro* de raízes do tipo “hairy roots” (HR) para as espécies cultivada e silvestres de *Arachis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de esterilização de sementes.
- Estabelecer um protocolo de obtenção *in vitro* de raízes do tipo “hairy roots” (HR).
- Estabelecer um protocolo de crescimento e desenvolvimento *in vitro* de raízes do tipo “hairy roots” (HR).

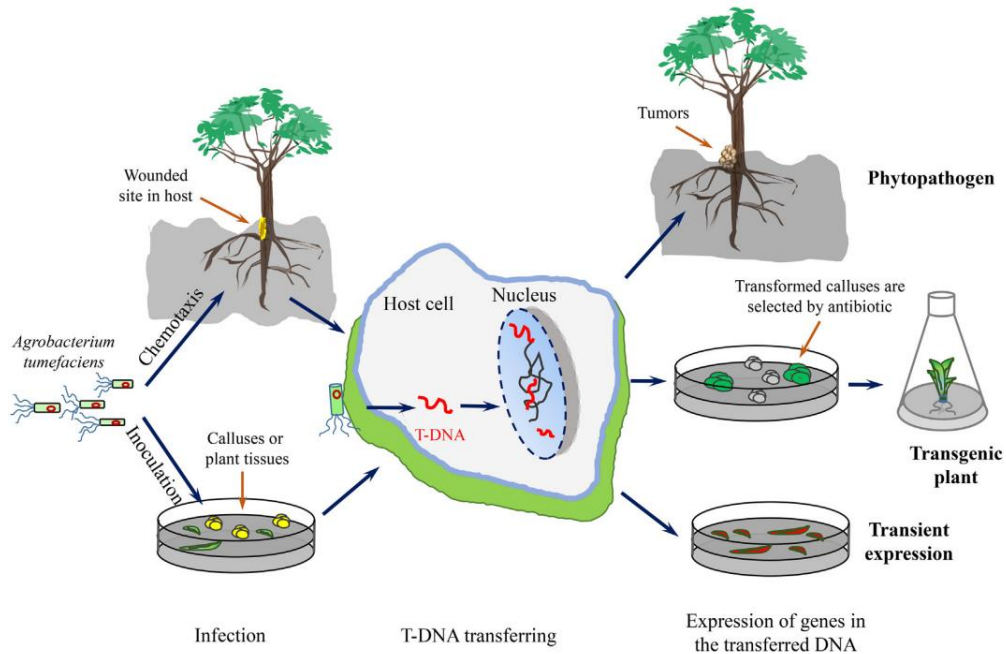
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Agrobacterium* spp.

As agrobactérias são bactérias fitopatogênicas de solo que têm como mecanismo de infecção a capacidade natural de transferir DNA para o genoma das plantas hospedeiras, (de Saeger et al. 2021) esta característica torna as agrobactérias uma ferramenta ideal para a transformação genética de plantas. As duas principais espécies *Agrobacterium* de interesse biotecnológico são: *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*.

*Agrobacterium tumefaciens* é o agente causador da galha-da-coroa, doença que afeta muitas espécies de plantas dicotiledôneas causando o sintoma característico de formação de galhas na coroa, junção entre o caule e a raiz (Thompson et al. 2020). Da mesma maneira, *Agrobacterium rhizogenes* induz a formação de raízes adventícias no local do ferimento, sintoma que é chamado de raízes-em-cabeleira ou HR (sigla do inglês "hairy root") (Bahramnejad et al. 2019).

A formação de galhas ou raízes por linhagens patogênicas é o resultado de um processo natural de transferência de genes de *Agrobacterium* spp. para o genoma da planta infetada e sua posterior expressão no sistema eucariota vegetal. Estes genes que as agrobactérias transferem para a planta hospedeira, conhecidos como oncogenes, estão contidos em um plasmídeo de alto peso molecular (120 a 250 kb), denominado Ti ("Tumor inducing") e Ri ("Root inducing"), presente em todas as linhagens patogênicas de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente. Duas regiões do plasmídeo Ti estão diretamente envolvidas na indução do tumor: a região-T, que contém os oncogenes e corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal (Figura 1), e a região de virulência (região vir), que contém genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência da região-T. A região-T, uma vez transferida e integrada no genoma da célula vegetal, passa a ser denominada de T-DNA ("transferred DNA") (Guo et al. 2019).



**Figura 1:** Diagrama da infecção natural e transformação de plantas *in vitro* via *Agrobacterium tumefaciens*. Fonte: Guo et al. 2019

Os oncogenes presentes no T-DNA de *A. tumefaciens* quando expressos na planta hospedeira codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese de reguladores de crescimento, auxinas e citocininas. A síntese desses reguladores pelas células transformadas causa um desbalanço hormonal, levando à multiplicação desordenada das células transformada e a posterior formação do tumor no local da infecção. Já para e *A. rhizogenes*, os oncogenes codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese de auxinas, induzindo assim a formação de raízes-em-cabeleira, caracterizada pelo crescimento de raízes adventícias no local do ferimento. Outro grupo de genes presentes no T-DNA, tanto de *A. tumefaciens* quanto *A. rhizogenes*, codifica enzimas responsáveis pela síntese de opinas, compostos formados pela condensação de aminoácidos ou carboidratos modificados, que são catabolisadas especificamente pela agrobactéria colonizadora, como fonte de nutrientes (Gelvin 2021).

### 3.2 Aplicação biotecnológica de raízes do tipo HR induzidas pela infecção por *Agrobacterium rhizogenes*

O sistema de cultura *in vitro* de raízes do tipo HR é uma poderosa ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada na produção de metabólitos secundários, como

o resveratrol. Raízes transgênicas do tipo HR transformadas por linhagens silvestres de *A. rhizogenes* se desenvolvem rapidamente em meio de cultura líquido sem a necessidade de suplementação com fitormônios e podem, assim, ser utilizadas como biofábricas na produção de proteínas heterólogas ou de metabólitos. Raízes do tipo HR são capazes de excretar para o meio líquido moléculas bioativas em grande quantidade e com alta eficiência (Mallikarjuna et al. 2016).

Além disso, estudos anteriores demonstraram que em um sistema cultivado *ex vitro*, raízes HR em folhas destacadas de *Arachis* spp. podem ser utilizadas para avaliar genes candidatos à resistência a nematoide das galhas (Guimaraes et al. 2017).

### **3.3 Metodologias de transformação de plantas *in vitro* de *Arachis hypogaea* via *Agrobacterium rhizogenes*.**

Na literatura é possível encontrar diferentes trabalhos que descrevem distintas metodologias de transformação de amendoim cultivado (*A. hypogaea*) mediada por *A. rhizogenes* para obtenção e cultura *in vitro* de raízes do tipo HR para produção de estilbenos bioativos, incluindo o resveratrol (Gajurel et al. 2021; Kim et al. 2008; Liu et al. 2016; Medina-Bolivar et al. 2007) algumas destas metodologias, como a utilizada por Liu e colaboradores (Liu et al 2016), são adaptações de protocolos de transformação de soja. Estes protocolos utilizam diferentes cultivares de amendoim e de linhagens de *A. rhizogenes* assim como meios de crescimento dos explantes e de crescimento das raízes HR com distinta composição e concentração nutricional; acréscimo de hormônio de crescimento exógeno; níveis de aeração no meio líquido; entre outros.

Apesar de existirem artigos que descrevem protocolos para o cultivo *in vitro* de espécies silvestres de *Arachis* visando sua micropropagação e conservação de germoplasma (Gagliardi 2002; Pacheco 2009), não há nenhum protocolo descrito para o crescimento e cultivo *in vitro* de raízes do tipo HR obtidas pela transformação via *Agrobacterium rhizogenes*.

## 4. METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga III (LPP-III) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada no Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final) – Brasília, DF – CEP, 70770-917.

### 4.1. Material vegetal

Foram utilizadas sementes de amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* cv. Runner IAC 886) e de amendoim silvestre (*A. stenosperma* acesso V10309) obtidas a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação e que, após a colheita, foram armazenadas a 4 °C em câmara fria.

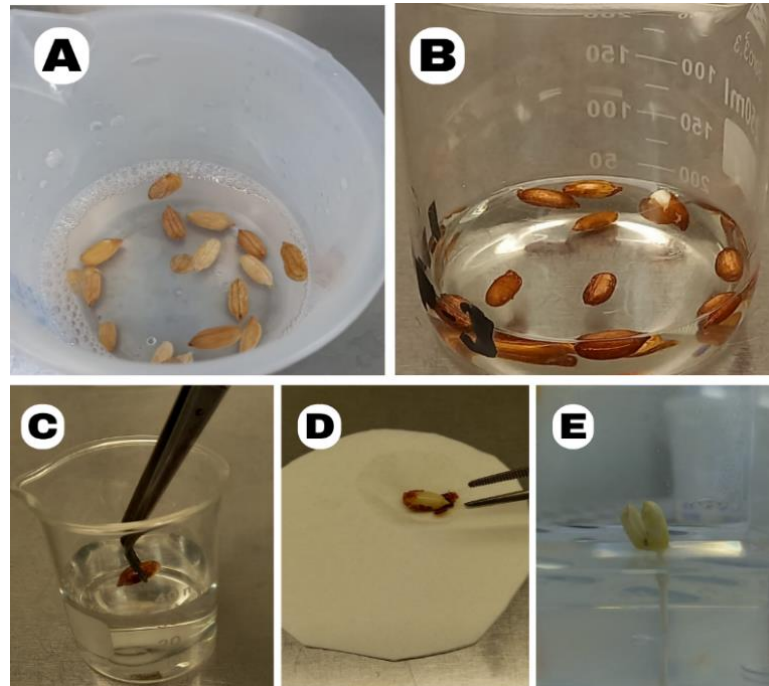
### 4.2. Linhagens de *Agrobacterium rhizogenes*

As linhagens silvestres 'K599' e 'A4' de *Agrobacterium rhizogenes* foram utilizadas para a transformação genética de diferentes folhas destacadas de *A. hypogaea* e *A. stenosperma*. Ambas as linhagens contêm o vetor binário pPZP-BAR-AdSTS1 (Figura 2 A) ou o vetor binário pPZP-BAR-AsSTS2 (Figura 2 B) que foram inseridas nas bactérias através do processo de eletroporação. Os transgenes *AdSTS1* e *AsSTS2* foram isolados de duas espécies silvestres de amendoim, *A. duranensis* e *A. stenosperma*, respectivamente (Martins et al. 2022), e clonados no vetor binário pPZP-BAR para superexpressão em plantas. O vetor binário pPZP-BAR (Mota et al. 2020) contém, além do cassete para clonagem do gene candidato, o gene marcador de seleção BAR (resistência ao herbicida glufosinato de amônio) e o gene repórter eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) (Figura 2).





sólido com metade da concentração de sais (MS0,5X) contendo sacarose a 3% (m/v) e fitigel a 0,3% (m/v) (Figura 3E).



**Figura 3:** Processo de esterilização das sementes de amendoim, passando pelas etapas de **(A)** lavagem na água com detergente, **(B)** incubação no hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), **(C)** enxague em água estéril, **(D)** retirada da testa e **(E)** semeadura no meio de germinação.

As sementes então foram germinadas em condições controladas de crescimento ( $25 \pm 2$  °C; 12 horas de fotoperíodo; 120  $\mu$ mol de intensidade de luz), em sala de cultura.

#### 4.4. Estabelecimento de um protocolo de obtenção *in vitro* de raízes do tipo HR de *Arachis* spp.

Uma vez determinados os parâmetros de esterilização de sementes, os seguintes parâmetros para obtenção *in vitro* de raízes do tipo HR foram avaliados, visando a produção raízes saudáveis, em grande quantidade e em menor tempo: (i) o melhor meio de cultivo de crescimento das bactérias, dentre os dois utilizados (LB e YEP), (ii) idade das plantas ao retirar os explantes (folha destacada), (iii) definição da linhagem de *A. rhizogenes* que apresenta maior eficiência de transformação.

#### **4.5. Análise de raízes do tipo HR de *Arachis* spp.**

A transgenia das raízes com fenótipo HR foi confirmada por meio da observação da fluorescência da proteína GFP (proteína verde-fluorescente) no comprimento de onda de 488 nm em dois tipos de equipamento: (i) uma lâmpada UV portátil Dark Reader modelo HL34T (Clare Chemical Research, Estados Unidos) e (ii) um microscópio estereoscópio de fluorescência Leica M205 FA (Leica Microsystem, Alemanha).

#### **4.6. Estabelecimento de um protocolo de cultivo *in vitro* de raízes do tipo HR de *Arachis* spp.**

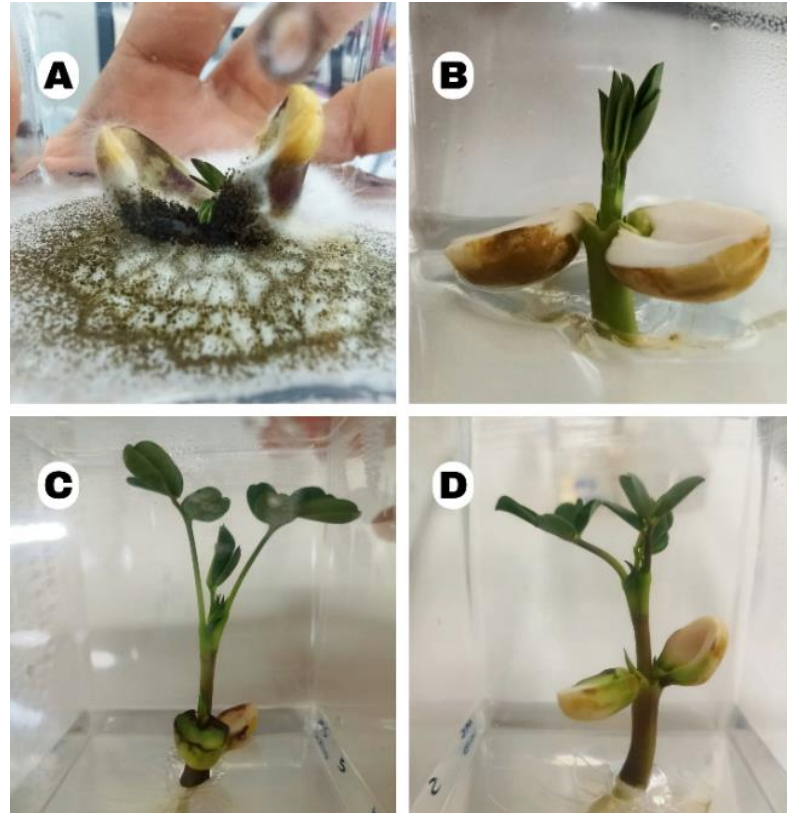
É nessa etapa em que o trabalho se encontra atualmente e até o momento não se tem resultados concretos. Contudo, uma vez otimizados os protocolos de esterilização de sementes e de obtenção *in vitro* de raízes do tipo HR, os seguintes parâmetros para seu crescimento e desenvolvimento serão avaliados, visando a forma mais eficiente de cultivar as raízes: (i) composição do meio de cultura de crescimento das raízes HR (açúcar e concentração de sais), (ii) fatores ambientais (luz, temperatura) e (iii) antibióticos adequados para evitar contaminação do meio de cultura.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Esterilização das sementes de *Arachis* spp.

O melhor tempo de desinfestação das 20 sementes de *A. hypogaea* com hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) foi por 5 minutos, pois com 10 minutos de imersão houve comprometimento da germinação, isto é, a germinação diminuiu de 90% (18/20) para 50% (10/20). Para as sementes de *A. stenosperma*, 5 minutos de imersão em hipoclorito não foram suficientes para desinfestação pois algumas sementes apresentaram contaminação (Figura 4A). Assim, utilizou-se 10 minutos de imersão que foi suficiente para permitir uma boa esterilização das sementes de *A. stenosperma* sem prejuízo na taxa de germinação que se manteve em torno de 80% (16/20) (Figura 4B). A necessidade de um maior tempo de desinfestação entre sementes da espécie cultivada e da silvestre é provavelmente devido as sementes de *A. hypogaea* terem sido descascadas e pré-lavadas antes de serem armazenadas, enquanto as sementes de *A. stenosperma* foram armazenadas ainda com casca, então possivelmente ainda haviam resquícios de solo com microrganismos aderidos à elas e o enxágue em água corrente e a incubação em água com detergente não foram suficientes para fazer a limpeza dessas sementes, sendo assim necessário compensar no aumento de tempo da incubação em hipoclorito.

Após germinação, tanto as plantas de *A. hypogaea* quanto de *A. stenosperma* não apresentaram diferença fenotípica no seu desenvolvimento entre serem germinadas em meio MS1X ou MS0,5X (Figuras 4C e D). Assim, optou-se pelo uso do meio MS0,5X para economia de reagentes.



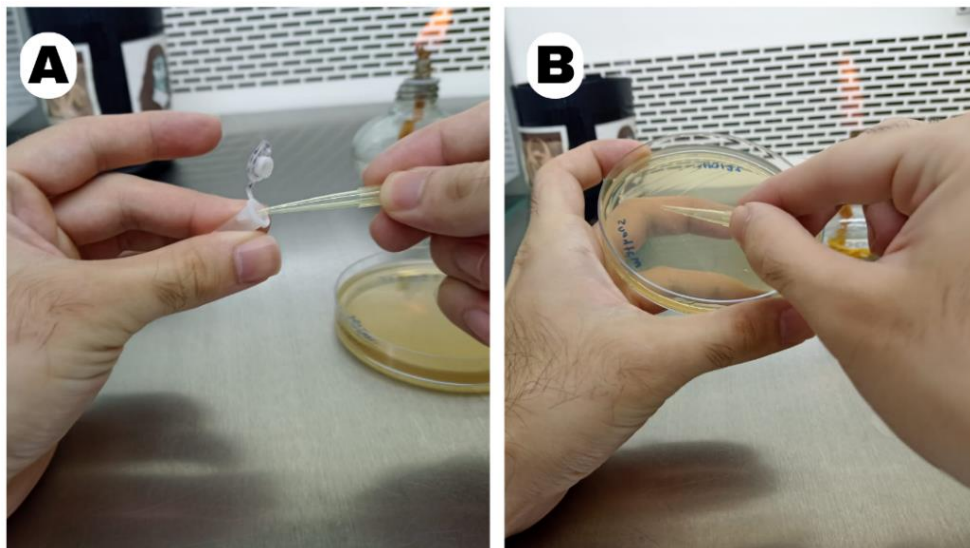
**Figura 4:** (A) Semente de *A. stenosperma* que foi esterilizada com hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 5 minutos apresentando contaminação fúngica e (B) plântula germinando livre de contaminações cuja semente foi esterilizada com hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 10 minutos. Plântula de *Arachis hypogaea* crescendo em (C) meio MS1X e em (D) MS0,5X.

Foi feito um teste da utilização de gás de cloro para esterilização de sementes de *A. hypogaea*. Esse gás foi obtido pela diluição de 5 mL de ácido clorídrico 37% (v/v) em 50 mL de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), devido à alta toxicidade do gás de cloro essa manipulação foi realizada em uma capela de exaustão. Um béquer de 100 mL contendo essa reação de cloro foi colocado, junto com uma placa de Petri que continha 10 sementes de *A. hypogaea*, em uma caixa de plástico que foi tampada para conter o gás e mantida em repouso por duas horas, ao fim desse tempo a caixa foi aberta e placa com as sementes foi rapidamente vedada e transportada para a câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram postas no meio de germinação, (MS1X) contendo sacarose a 3% (m/v) e fitagel a 0,3% (m/v). Porém, nenhuma dessas sementes germinou, o que indica que a esterilização por gás de cloro, pelo menos com duas horas de exposição, é muito agressiva para sementes de *A. hypogaea*. Não foram realizados novos testes em diferentes tempos de exposição e gás de cloro não foi testado para esterilização de *A. stenosperma*.

## 5.2 Obtenção de raízes do tipo HR de *Arachis* spp.

### 5.2.1 Cultivo das linhagens de *Agrobacterium rhizogenes*

As linhagens silvestres 'K599' e 'A4' de *A. rhizogenes* carregando os vetores binários pPZP-BAR-AdSTS1 e pPZP-BAR-AsSTS2, foram retiradas do estoque glicérol à -80 °C (Figura 5A) e imediatamente estriadas, pelo “método de estrias por esgotamentos”, em placas de Petri com meio LB (Luria Bertani; Miller 1972) semi-sólido (Figura 5B) contendo ágar bacteriológico a 1,6% (m/v). Antibióticos de seleção específicos de cada linhagem de *A. rhizogenes*, estreptomicina 300 mg/L e canamicina 100 mg/L para a linhagem 'K599', e rifampicina 50 mg/L e canamicina 100 mg/L para a linhagem 'A4', também foram adicionados ao meio LB. A cultura de bactérias foi incubada a 28 °C por 48 horas.

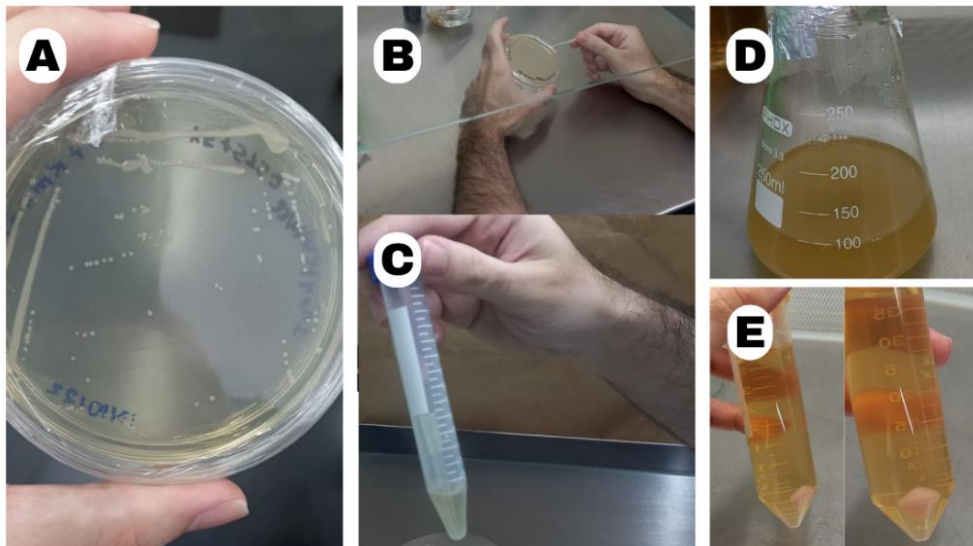


**Figura 5:** (A) Linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* carregando o vetor pPZP-BAR-AsSTS2 sendo retirada do estoque glicérol. (B) Estriamento da cultura de bactéria em placa de Petri com meio LB semi-sólido contendo ágar bacteriológico a 1,6% (m/v) e os agentes seletivos estreptomicina 300 mg/L e canamicina 100 mg/L.

A partir de uma colônia isolada de cada linhagem de *A. rhizogenes* (Figura 6A e B) foi feito um pré-inóculo em 1 mL de meio YEP (Yeast Extract Peptone; Sambrook, Fritsch e Maniatis 1989) líquido com os antibióticos correspondentes em um tubo de ensaio plástico de 15 mL (Figura 6C). A cultura de bactérias foi incubada em agitador tipo orbital a 28 °C e rotação de 180 rpm por cerca de 16 horas. Após o crescimento, o pré-inóculo foram diluídos em 100 mL de YEP líquido com os mesmos antibióticos

em um erlenmeyer de 250 mL (Figura 6D) e esse inóculo foi posto novamente no agitador tipo orbital a 28 °C e rotação de 180 rpm. O crescimento da cultura de bactérias foi monitorado por leituras da absorbância (A) em um espectrofotômetro até que se atingisse a absorbância entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda de 600 nm ( $A_{600}$ ). Estabeleceu-se que em 16 horas de cultivo do inóculo, nessas condições de temperatura e rotação, é necessário diluir 100  $\mu$ L do pré-inóculo da linhagem 'A4' de *A. rhizogenes* e 50  $\mu$ L da linhagem 'K599' para atingir a  $A_{600}$  desejada, indicando que a linhagem 'K599' tem um crescimento mais rápido do que a 'A4', pois nas mesmas condições de cultivo a linhagem 'K599' precisa ser mais diluída para atingir a  $A_{600}$  de interesse.

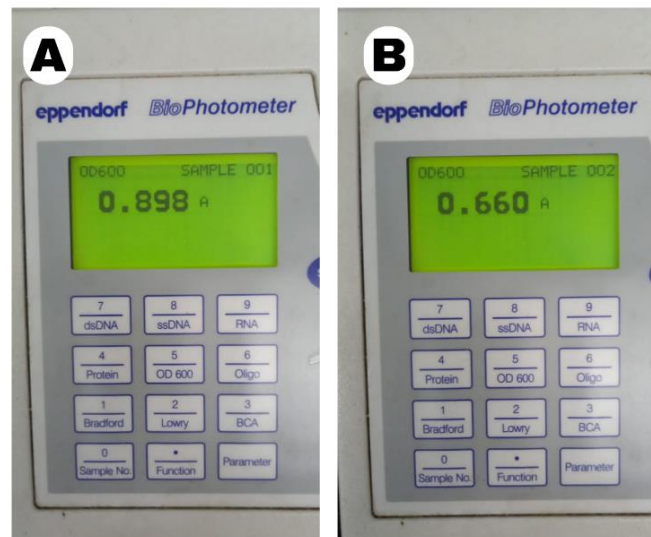
O inóculo foi então distribuído em tubos de ensaio de plástico de 50 mL e centrifugados a 1.500x g por 15 minutos, para concentrar as células bacterianas (Figura 6E). Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 50 mL de meio MS0,5X líquido e distribuídas em placas de Petri para a imersão dos explantes.



**Figura 6:** (A) Placa de meio LB semi-sólido apresentando crescimento bacteriano após 48 horas de crescimento, (B) colônia isolada retirada para preparo do (C) pré-inóculo de 1 mL, (D) 100  $\mu$ L do pré-inóculo diluídos em 100 mL de YEP líquido para preparo do inóculo e (E) concentrado de células bacterianas formado no fundo do tubo de ensaio após centrifugação.

Foi realizado um teste para avaliar qual meio líquido seria melhor para o cultivo de bactérias, para tanto todo o procedimento descrito acima foi repetido em paralelo com um pré-inóculo e inóculo da linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* carregando o vetor pPZP-BAR-AsSTS2 sendo cultivado em meio LB líquido. O resultado (Figura 7) foi de

que em meio YEP líquido as bactérias crescem um pouco mais rápido, pois sob as mesmas condições de temperatura e rotação as bactérias atingiram a  $A_{600}$  de 0,8 enquanto as que foram cultivadas em LB líquido atingiram  $A_{600}$  de 0,6. Ambos os meios são adequados para o cultivo de bactérias, mas nesse caso em específico o ideal é usar o inóculo cultivado em meio LB, pois na  $A_{600}$  de 0,6 essas bactérias estão no início da curva de crescimento e, portanto, mais ativas.



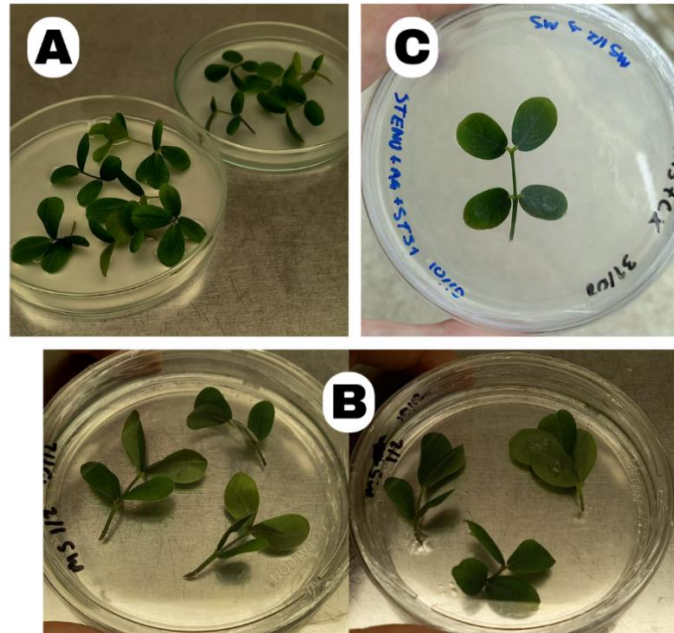
**Figura 7:** Leituras de  $A_{600}$  de inóculos da linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* carregando o vetor pPZP-BAR-AsSTS2 cultivados em (A) meio YEP líquido e (B) meio LB líquido.

### 5.2.2 Inoculação das folhas de *Arachis* spp.

Folhas intactas (quadrifoliadas) foram destacadas das plântulas crescidas *in vitro* de *Arachis* spp. com 15 dias após a germinação (item 5.1) mediante um corte no pecíolo com uma lâmina de bisturi, mantendo aproximadamente 2 cm do pecíolo. As folhas destacadas foram imediatamente imersas nas suspensões previamente preparadas das linhagens 'K599' ou 'A4' de *A. rhizogenes* (item 5.2) em 50 mL de meio MS0,5X líquido por 15 minutos (Figura 8A). Durante a incubação, foram feitos leves cortes de aproximadamente 0,5 cm nas folhas, para causar ferimentos por onde as bactérias podem penetrar, aumentando assim a chance infecção. Após a incubação com a bactéria, as folhas infectadas foram secas em papel filtro e transferidas para o meio de cocultivo (meio MS0,5X semi-sólido sem hormônio e sem antibióticos) (Figura 8B). Após dois dias de cocultivo no escuro, as folhas foram lavadas em água destilada estéril contendo cefotaxima 250 mg/L por 5 minutos, para deter o crescimento das bactérias, dificultando sua proliferação, para que elas não se



tornem um agente contaminante do meio de cultura. Após a lavagem, as folhas foram secas e transferidas para meio de crescimento (meio MS1X semi-sólido contendo cefotaxima 250 mg/L e suplementado com sacarose a 3% (m/v) até o surgimento das raízes do tipo HR (Figura 8C).



**Figura 8:** (A) Folhas de *A. stenosperma* imersas na suspensão de *A. rhizogenes*, (B) são transferidas para meio de cocultivo e (C), após dois dias, são transferidas para o meio MS1X semi-sólido com cefotaxima 250 mg/L.

Ao longo de quatro meses (agosto de 2022 a novembro de 2022) foram realizadas ao todo 11 ensaios de transformação com folhas destacadas de plantas *in vitro* de *A. hypogaea* (seis ensaios) e *A. stenosperma* (cinco ensaios). Destes 11 ensaios, o primeiro de *A. hypogaea* foi feito apenas com a linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* e o primeiro de *A. stenosperma* foi realizado apenas com a linhagem 'A4', os ensaios subsequentes foram realizados com ambas as linhagens. Todos esses ensaios foram realizados com as linhagens de *A. rhizogenes* contendo o vetor pPZP-BAR-AdSTS1, e tiveram uma média de 10 folhas inoculadas para cada linhagem de *A. rhizogenes* utilizada. A relação do total de folhas de *Arachis* spp. transformadas por linhagem de *A. rhizogenes* é apresentada na Tabela 1.

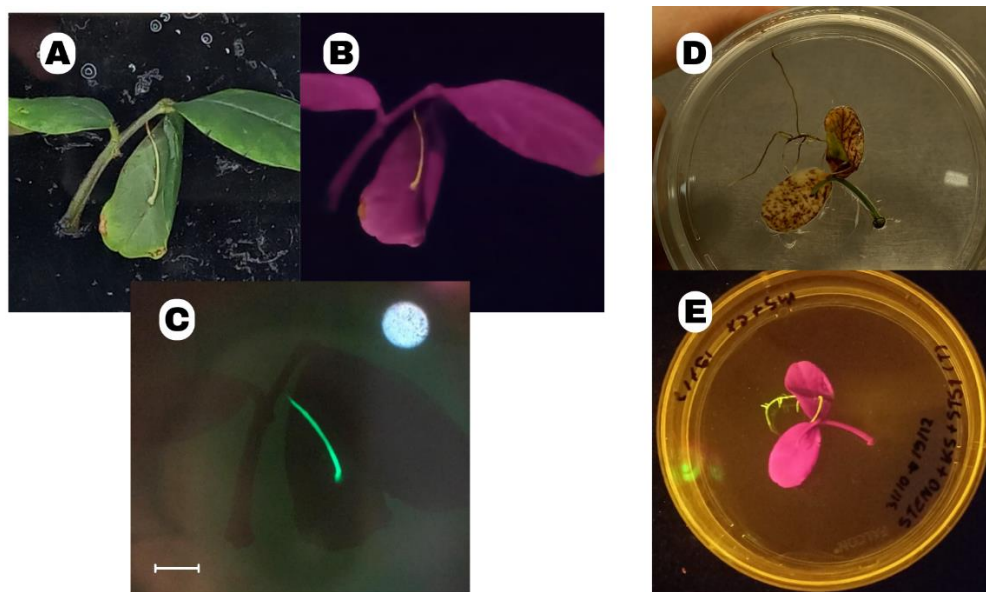
**Tabela 1:** Total de folhas de *Arachis* spp. inoculadas.

	<i>A. rhizogenes</i> 'K599'	<i>A. rhizogenes</i> 'A4'
<i>A. hypogaea</i>	62	49
<i>A. stenosperma</i>	41	56

A primeira inoculação com o vetor pPZP-BAR-AsSTS2 (linhagem 'K599' de *A. rhizogenes*) foi realizada em janeiro de 2023 com 25 folhas destacadas de *A. stenosperma*. Até o momento não apresentou crescimento de HR.

### 5.2.3 Crescimento e análise de raízes do tipo HR de *Arachis* spp.

Após cerca de 4 a 5 semanas em meio de crescimento, as primeiras raízes com fenótipo do tipo HR começam a surgir nas folhas, especificamente nos locais onde foram causados os ferimentos (Figura 9). Essas raízes foram então observadas em um microscópio estereoscópio de fluorescência ou em uma lâmpada portátil de luz UV para observação da fluorescência da proteína GFP (proteína verde-fluorescente) (Figura 9), visto que a GFP emite luz verde (508 nm) quando excitada por luz azul a 475 nm e ultravioleta (UV) a 395 nm (CHIU et al., 1996; CUBITT et al., 1995). Raízes expressando a GFP foram então consideradas como transgênicas, pois apresentam fenótipo de fluorescência verde conferida pela GFP, proteína expressa por um dos transgenes contidos no vetor pPZP-BAR, dessa forma também fica subtendido que o gene de interesse, *AdSTS1*, também foi transferido.



**Figura 9:** Confirmação da transgenia das raízes do tipo HR por meio da observação da fluorescência da GFP. (A) e (D) Folhas destacadas visualizadas sob luz branca, (B) e (E) sob luz UV da lâmpada portátil e (C) em microscópio estereoscópio de fluorescência com luz UV a 395 nm. Escala = 0,5 cm.

Das 62 folhas transformadas de *A. hypogaea* com a linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* apenas três raízes apresentaram fenótipo de HR e das 49 transformadas com a linhagem 'A4' somente uma apresentou fenótipo de HR, porém nenhuma delas foi confirmada como transgênicas, isto é, não expressaram a GFP. Esta ineficiência de transformação para o amendoim cultivado vai contra o que foi descrito nos protocolos encontrados na literatura nos quais a taxa de eficiência varia de 30% a 80% (Gajurel et al. 2021; Kim et al. 2008; Liu et al. 2016; Medina-Bolivar et al. 2007), dependendo do tipo de explante e linhagem de *A. rhizogenes* utilizados. Muito provavelmente a ineficiência observada aqui se deve a erros cometidos na manipulação e transformação das folhas, visto que essa técnica ainda não está totalmente dominada, ou possivelmente no sistema *in vitro*, a transformação de folhas de *A. hypogaea* cv Runner IAC 886 com as linhagens 'A4' e 'K599' de *A. rhizogenes* seja realmente pouco eficiente, mas ainda é necessário realizar mais ensaios para confirmar ou rejeitar essas hipóteses.

Para *A. stenosperma*, foi obtida 1 raiz com fenótipo de HR em uma das 56 folhas transformadas com a linhagem 'A4' de *A. rhizogenes*, mas essa raiz era GFP negativa, ou seja, não apresentavam fluorescência quando expostas à luz UV. As primeiras raízes HR que eram GFP positivas foram obtidas na penúltima transformação realizada em 2022, em *A. stenosperma* transformada com a linhagem 'K599' de *A. rhizogenes*, de uma transformação feita em 10 explantes, 2 deles apresentaram crescimento de HR positivas. Com base somente no resultado da transformação que rendeu HR que eram GFP positivas, poderia estimar que a eficiência de transformação das plantas de *A. stenosperma* seria de 20%, sendo 2 HR positivas de 10 explantes transformados, mas quando é calculada a eficiência para as 41 folhas de *A. stenosperma* transformada com a linhagem 'K599' de *A. rhizogenes* o valor é de 4,88%, como apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Eficiência de transformação (raízes GFP positivas/folhas transformadas) de *Arachis* spp. transformadas com as linhagens 'K599' e 'A4' de *A. rhizogenes*.

	Folhas Transformadas	Raízes com fenótipo de HR	Raízes GFP positivas	Eficiência de transformação (%)
<i>A. hypogaea</i> + 'K599'	62	3	0	0
<i>A. hypogaea</i> + 'A4'	49	1	0	0
<i>A. stenosperma</i> + 'K599'	41	2	2	4,88
<i>A. stenosperma</i> + 'A4'	56	1	0	0

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ao fim deste trabalho pode-se concluir que:

- Um protocolo eficiente de desinfestação e esterilização de sementes de *A. hypogaea* e de *A. stenosperma* foi desenvolvido.

- É possível obter raízes do tipo HR *in vitro* a partir de folhas destacadas de *A. hypogaea* e de *A. stenosperma*, a partir da adaptação para nossas condições de laboratório de protocolos previamente descritos na literatura científica por outros grupos de pesquisa.

- A eficiência de transformação para *A. hypogaea* foi de 0%, isto é, até então não foi obtida nenhuma raiz comprovadamente transgênicas a partir das folhas cocultivadas.

- A eficiência de transformação para *A. stenosperma* foi de 4%, isto é, foram obtidas 2 raízes comprovadamente transgênicas a partir de 50 folhas cocultivadas.

Como próximas etapas do estudo, pretende-se aumentar a eficiência de obtenção de raízes do tipo HR em espécies cultivadas e silvestres de amendoim por meio de ajustes de protocolos como: (i) testar outro tipo de explante, por exemplo cotilédone e hipocótilo; (ii) aumentar o tempo de imersão das folhas (ou outro explante a ser testado); (iii) adicionar acetoseringona na suspensão de bactérias e no meio de cocultivo; (iv) aumentar o tempo de cocultivo de 2 para 3 dias.

Uma vez aumentada a eficiência de obtenção de raízes do tipo HR, o próximo desafio será cultivar essas raízes em meio líquido. Assim será possível no futuro extrair e quantificar o resveratrol exsudado no meio líquido pelas raízes transgênicas supressando os genes *AdSTS1* e *AsSTS2*.

## 7. REFERÊNCIAS

- BAHRAMNEJAD, B.; NAJI, M.; BOSE, R.; JHA, S. A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances*, v. 37, nº 7, 2019.
- BRASILEIRO, A.C.M. e CARNEIRO, V.T.C. *Manual de transformação genética de plantas*. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 2015.
- CARVALHO, P.A.S.V.; BRASILEIRO, A.C.M.; LEAL-BERTIOLI, S.; BERTIOLI, D.J.; SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; GIMENES, M.A. Coupled transcript and metabolite identification: insights on induction and synthesis of resveratrol in peanut, wild relatives and synthetic allotetraploid. *Genetics and Molecular Research* v. 16, nº 16039802, 2017
- CARVALHO; P.A.S.V.; MORETZSOHN, M.C.; BRASILEIRO, A.C.M.; GUIMARÃES, P.M.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; DA SILVA, J.P.; GIMENES, M.A. Evidences that polyploidization and hybridization affected resveratrol content in *Arachis* interspecific hybrids. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, v. 11, nº 194B82F62516, p. 265–270, 2019.
- CARVALHO; P.A.S.V.; MORETZSOHN, M.C.; BRASILEIRO, A.C.M.; GUIMARÃES, P.M.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; DA SILVA, J.P.; GIMENES, M.A. Presence of resveratrol in wild *Arachis* species adds new value to this overlooked genetic resource. *Scientific Reports*, v.10, nº 12787, p. 1-9, 2020.
- CHUI, W.-L.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRAMO, T.; KOBAYASHI, H.; SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, v. 6, nº 3, p. 325-330, 1996.
- CUBITT, A. B.; HEIM, R.; ADAMS, S. R.; BOYD, A. E.; GROSS, L. A.; TSIEN, R, Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochemistry Science*, v. 20, nº 11, p. 448-455, 1995.
- DE SAEGER, J.; PARK, J.; CHUNG, H. S.; HERNALSTEENS, J.-P.; VAN LIJSEBETTENS, M.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; DEPUYDT, S. *Agrobacterium* strains and strain improvement: Present and outlook. *Biotechnology Advances*, v. 53, p. 107677, 2021.
- FAN, E.; ZHANG, K.; ZHU, M.; WANG, Q. Obtaining resveratrol: from chemical synthesis to biotechnological production. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 7, nº 4, p. 272–281, 2010.
- GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Germplasm Preservation of Wild *Arachis* Species through Culture of Shoot Apices and Axillary Buds from In Vitro Plants. *Biologia Plantarum*, v. 45, nº 3, p 353–357, 2002.
- GAJUREL, G., HASAN, R., & MEDINA-BOLIVAR, F. Antioxidant assessment of prenylated stilbenoid-rich extracts from elicited hairy root cultures of three cultivars of peanut (*Arachis hypogaea*). *Molecules*, v. 26, nº 22: 6778, 2021.

GELVIN, S.B. Plant DNA Repair and *Agrobacterium* T-DNA Integration. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n° 16, 2021.

GUIMARAES, L.A.; PEREIRA, B.M.; ARAUJO, A.C.G.; GUIMARAES, P.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Ex vitro hairy root induction in detached peanut leaves for plant–nematode interaction studies. *Plant Methods*, v. 13, n° 25, 2017.

GUO, M.; YE, J.; GAO, D.; XU, N.; YANG, J. *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology Advances*, v. 37, n° 1, p. 259-270, 2019.

HALDER, M; SARKAR, S; JHA, S. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*, v 19, n° 12, p. 880-895, 2019.

KIM, J.S.; LEE, S.Y.; PARK, S.U. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n° 20, p. 3788–3790, 2008.

LIU, S.; SU, L.; LIU, S.; ZENG, X.; ZHENG, D.; HONG, L.; LI, L. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Arachis hypogaea*: an efficient tool for functional study of genes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 5, n° 14, p 869-878, 2016.

MALLIKARJUNA, G; RAO, T.S.R.B; KIRTI, P.B. Genetic engineering for peanut improvement: current status and prospects. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* v.125, p. 399–416, 2016.

MARTINS, A.C.Q.; MOTA, A.P.Z.; CARVALHO, P.A.S.V.; PASSOS, M.A.S.; GIMENES, M.A.; GUIMARAES, P.M.; BRASILEIRO, A.C.M. Transcriptome Responses of Wild *Arachis* to UV-C Exposure Reveal Genes Involved in General Plant Defense and Priming. *Plants* v. 11, n° 3, 2022.

MEDINA-BOLIVAR, F.; CONDORI, J.; RIMANDO, A. M.; HUBSTENBERGER, J.; SHELTON, K.; O'KEEFE, S. F.; BENNETT, S.; DOLAN, M. C. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, v. 68, n° 14, p. 1992–2003, 2007.

MEHROTRA, S.; SRIVASTAVA, V., RAHMAN; L.U.; KUKREJA, A. K. Hairy root biotechnology—indicative timeline to understand missing links and future outlook. *Protoplasma* v. 252, p. 1189–1201, 2015.

MILLER, J. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.

MOTA, A.P.Z.; BRASILEIRO, A.C.M.; VIDIGAL, B.; OLIVEIRA, T.N.; MARTINS, A.C.Q.; SARAIVA, M.A.P.; ARAÚJO, A.C.G.; TOGAWA, R.C.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUIMARAES, P.M. Defining the combined stress response in wild *Arachis*. *Scientific Reports.*, v. 11, n° 11097, 2021.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* v. 15 p. 473-497, 1962.
- PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; VALLS, J.F.M.; MANSUR, E. Micropropagation and in vitro conservation of wild *Arachis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 99, p. 239–249, 2009.
- PEZZUTO, J.M. Resveratrol: twenty years of growth, development and controversy. *Biomolecules & therapeutics*, v. 27, nº 1, p. 1, 2019.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- THAPA, S. B.; PANDEY, R. P.; PARK, Y. I.; SOHNG, J. K. Biotechnological advances in resveratrol production and its chemical diversity. *Molecules*, v. 24, n. 14, p. 2571, 2019.
- THOMPSON, M.G.; MOORE, W.M.; HUMMEL, N.F.C.; PEARSON, A.N.; BARNUM, C.R.; SCHELLER, H.V; SHIH, P. M. *Agrobacterium tumefaciens: A Bacterium Primed for Synthetic Biology*. *BioDesign Research*, 2020.
- TIAN, B.; LIU, J. Resveratrol: A review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, nº 4, p. 1392-1404, 2020.
- ZHANG, L.-X.; LI, C.-X.; KAKAR, M. U.; KHAN, M. S.; WU, P.-F.; AMIR, R. M.; DAI, D.-F.; NAVEED, M.; LI, Q.-Y.; SAEED, M.; SHEN, J.-Q.; RAJPUT, S. A.; LI, J.-H. Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 143, nº 112164, 2021.