



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Transcritômica e proteômica aplicadas à prospecção de genes candidatos envolvidos na resposta de defesa aos estresses biótico e abiótico em *Arachis* spp.

Andressa da Cunha Quintana Martins

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Co-orientadora: Dra. Patrícia Messenberg Guimarães

Brasília – DF

2019



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Transcritômica e proteômica aplicadas à prospecção de genes candidatos envolvidos na resposta de defesa aos estresses biótico e abiótico em *Arachis* spp.

Andressa da Cunha Quintana Martins

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Co-orientadora: Dra. Patrícia Messenberg Guimarães

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológica, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Biologia Molecular.

Brasília – DF

2019

Tese de autoria de Andressa da Cunha Quintana Martins, intitulada “Transcritômica e proteômica aplicadas à prospecção de genes candidatos envolvidos na resposta de defesa aos estresses biótico e abiótico em *Arachis* spp.”, realizada junto ao Departamento de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Professor Dr. Robert Neil Gerard Miller e co-orientação da Dra. Patrícia Messenberg Guimarães, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF).

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller (Orientador) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

Co-orientadora: Dra. Patrícia Messenberg Guimarães (Co-orientadora) - Laboratório de Interação Planta-Praga III, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Membro interno: Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha - Departamento de Biologia Celular Universidade de Brasília.

Membro interno: Prof. Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos - Departamento de Fitopatologia Universidade de Brasília.

Membro externo: Dra. Carolina Vianna Morgante - Embrapa Semiárido

Suplente: Prof. Dr. Ricardo Henrique Kruger - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília

À Deus, aos meus pais, Erivaldo e Rosemar,
às minhas irmãs, Anna Paula e Larissa, à
minha segunda mãe, Silvana e à minha
“sombriinha”, Catarina, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP/DF) pelo apoio financeiro para execução do projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo nos dois primeiros anos de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de estudos e taxa de bancada aos dois últimos anos de doutorado.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo espaço, infraestrutura e recursos operacionais disponibilizados para execução de todo meu projeto.

Aos meus queridos orientadores, professor Dr. Robert Neil Gerard Miller e Dra. Patrícia Messenberg Guimarães, que me acompanharam durante esses longos anos de formação acadêmica, da graduação ao doutorado, sempre com muito carinho, incentivo e aprendizado. Obrigada por acreditarem e confiarem em mim!

A Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro, pelo acolhimento, pelo carinho de sempre, pelos constantes ensinamentos e suportes necessários disponibilizados.

A Dra. Ana Claudia Guerra Araujo, pelo carinho, pela ajuda nos diversos experimentos, nos conselhos, nas correções e sugestões e nos momentos de descontrações.

A Dra. Angela Mehta, pelo acolhimento em seu laboratório, pelo carinho com o qual me ensinou e me ajudou a realizar as análises proteômicas e a escrita.

A Dra. Regina Carneiro, pela disponibilização do nematoide aqui utilizado, pelos ensinamentos nematológicos e pela paciência em me ajudar.

Aos membros minha da banca, professora Dra. Eliane Ferreira Noronha, professor Dr. Jansen Rodrigo Pereira Santos e a Dra. Carolina Viana Morgante, pelo interesse e disposição em me ajudar na melhora do meu trabalho final.

Ao Leandro Mesquita, por sempre cuidar com tanto carinho das nossas plantinhas nas casas de vegetação.

Ao Mário Alfredo Passos Saraiva, por não deixar que nada faltasse no laboratório, pela amizade, gargalhadas e pelas corridas de RT-qPCR.

Aos meus queridos amigos dos Laboratórios de Interação Planta-Praga III (Thaís Nicolini, Eliza Bellard, Bruna Medeiros, Mário Saraiva, Bruna Vidigal, Larissa Arrais, Ana Luisa Lacerda, Andreza Vidal, Bruna Pinheiro, Dione Alves e Christina Vinson), de Genômica e Proteômica (Lilian Travassos, Cristiane Santos, Daiane Gonçalves, Ivonaldo Reis, Fabiano Távora, Mariana Maximiano, Claudia Crasto e Luciana Labuto), de Bioinformática (Ana Zotta, Roberto Togawa e Priscila Grynberg) e de Nematologia (Vanessa Mattos e Jessica Monteiro), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,

muitíssimo obrigada por todo apoio e ajuda emocional, operacional e experimental. Cada um de vocês me ajudou a chegar aqui.

Aos meus amados amigos, Thaís Nicolini, Roberta Ferreira, Lígia Almeida, Eduardo Paiva, Iara Paiva, Perla Villalba, Luisa Ferraço, Bárbara e Larissa Gaspar, por todo carinho, conselho e apoio que me ofereceram todas as vezes que precisei.

Ao meu namorado, Ramiro Nicolodi Gomes, pela paciência, pelo carinho, pelos kits anti-estresse e pelos infinitos incentivos que me deu, fazendo eu acreditar que podia e que eu conseguiria! Obrigada por tudo, meu lindo!

A minha família, que torceu, que se preocupou, que incentivou e que vibrou com essa conquista. Muito obrigada pela ajuda e pela compreensão nos momentos difíceis.

A todos que me ajudaram, me incentivaram de alguma forma e torceram por mim, de perto ou de longe, muito obrigada!

A Deus, por ser tão maravilhoso comigo! Por me proporcionar tantas coisas boas, tantas oportunidades, tantas experiências, tantos aprendizados, tantas pessoas amadas ao meu redor! Obrigada por sempre estar comigo, me fortalecendo, me guiando, me abençoando.

Por tudo dito e por tudo guardado em meu coração, sou extremamente grata a todos vocês!

SUMÁRIO

Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	16
REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1.1. O amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	17
1.2. O gênero <i>Arachis</i> e o uso de espécies silvestres no melhoramento genético do amendoim.....	18
1.3. <i>Arachis duranensis</i> e <i>Arachis stenosperma</i> Krapov. e W. C. Gregory.....	20
1.4. Principais fatores responsáveis pela redução da produtividade	21
1.5. Seca	21
1.6. Nematóide das galhas	24
1.7. Nematóide das galhas no amendoim.....	26
1.8. Interação planta- <i>Meloidogyne</i> spp.	27
1.9. Abordagens “ômicas” para o estudo de genes associados a resposta de defesa da planta.....	28
OBJETIVOS	31
CAPÍTULO 1 – Proteômica comparativa e análise da expressão gênica em <i>Arachis duranensis</i> revelam proteínas de resposta ao estresse associadas à tolerância à seca ..	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos.....	34
2.1. Crescimento e tratamento das plantas de <i>Arachis duranensis</i>	34
2.2. Avaliação do teor de clorofila, extravasamento de eletrólitos e teor relativo de água	35
2.3. Extração de proteína e análise 2-DE	35
2.4. Análise das imagens dos géis e identificação de proteínas	36
2.5. Análise por RT-qPCR	36
3. Resultados e Discussão.....	38
3.1. Perfil de transpiração, conteúdo de clorofila, extravasamento de eletrólitos e teor relativo de água após <i>dry-down</i>	38
3.2. Proteínas responsivas à seca em raízes de <i>A. duranensis</i>	40
3.3. Proteínas relacionadas a estresse.....	40

3.4.	Proteínas relacionadas ao processamento de RNA ou com função hipotética...	46
3.5.	Proteínas exclusivas de raízes de plantas de <i>A. duranensis</i> não estressadas...	47
3.6.	Análise comparativa do proteoma e da expressão gênica em raízes estressadas	48
4.	Conclusão	51
CAPÍTULO 2 – Proteômica revela genes candidatos para resistência a <i>Meloidogyne</i> em <i>Arachis</i> silvestre.....		52
1.	Introdução	53
2.	Material e Métodos.....	56
2.1.	Crescimento de plantas e tratamento	56
2.2.	Extração de proteína	56
2.3.	Análise 2-DE (eletroforese bidimensional).....	56
2.4.	Identificação de proteínas – 2DE	57
2.5.	Preparação das amostras para análise por 2D-NanoUPLC-MS ^E	57
2.6.	Análise por 2D-NanoUPLC-MS ^E	58
2.7.	Classificação funcional das proteínas e análise da interação proteína-proteína	58
2.8.	Análise <i>in silico</i> da expressão gênica.....	59
2.9.	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	59
2.10.	Desenho dos <i>primers</i> e análise por RT-qPCR.....	59
2.11.	Análise comparativa da abundância proteica versus expressão gênica.....	60
3.	Resultados	60
3.1.	Análise 2-DE da interação planta-nematoide.....	60
3.2.	Análise 2D-NanoUPLC-MS ^E	66
3.3.	Classificação funcional das proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS ^E	66
3.4.	Rede de interação proteína-proteína	67
3.5.	Análise do transcrito e proteoma	68
4.	Discussão	72
5.	Conclusão	74
CAPÍTULO 3 – Avaliação <i>in planta</i> dos genes-candidatos.....		75
1.	Introdução	76
2.	Material e Métodos.....	78
2.1.	Seleção de genes candidatos para avaliação da superexpressão <i>in planta</i> ..	78
2.2.	Construção do vetor de expressão.....	78
2.3.	Transformação de <i>Agrobacterium</i> spp. com os genes candidatos	79
2.4.	Transformação de folha destacada de <i>Arachis hypogaea</i> com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	80
2.5.	Avaliação da infecção do nematoide em raízes transgênicas.....	80

2.6.	Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	80
2.7.	Avaliação das plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> sob estresse hídrico	81
2.8.	Avaliação da expressão gênica.....	81
3.	Resultados	82
3.1.	Seleção dos genes candidatos para avaliação <i>in planta</i>	82
3.2.	Transformações das linhagens de <i>Agrobacterium</i> spp	82
3.3.	Transformação de folhas destacadas de <i>Arachis</i> com <i>AdCht2</i> e <i>AsMLP34</i> e avaliação de seu efeito na resistência ao nematoide das galhas	83
3.4.	Transformação de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> com <i>AdCht2</i> e <i>AsMLP34</i> e análise na tolerância à seca.....	85
4.	Discussão	87
	Conclusões e Perspectivas.....	91
	Referências Bibliográficas	92
	Apêndices.....	120

RESUMO

Muitos fatores bióticos e abióticos podem limitar a produtividade e a qualidade dos grãos de amendoim, especialmente considerando que essa cultura é amplamente cultivada nos trópicos semiáridos e por agricultores com poucos recursos. Tanto a seca quanto os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são problemas que afetam não apenas a cultura do amendoim, mas também outras culturas, representando uma ameaça mundial à produção agrícola e a segurança alimentar. O amendoim (*Arachis hypogaea*) apresenta alta suscetibilidade a diferentes estresses ambientais e ataques de patógenos. Por outro lado, seus parentes silvestres apresentam maior adaptabilidade a ambientes adversos e resistência a inúmeros fitopatógenos, mostrando-se importantes fontes de resistência alélica aos estresses bióticos e abióticos para o melhoramento genético do amendoim. Neste estudo, proteínas obtidas a partir de tecidos radiculares tanto de plantas de *A. duranensis* submetidas a diminuição gradual de água no solo quanto de plantas de *A. stenosperma* inoculadas com nematoide das galhas, foram analisadas, assim como sua abundância diferencial em relação aos perfis de expressão de seus transcritos correspondentes obtidos por RNA-Seq e RT-qPCR. Utilizando a abordagem 2-DE, um total de 31 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) foram identificadas em raízes de *A. duranensis* e 21 em raízes de *A. stenosperma*. Além disso, 222 DAPs também foram identificadas pela análise 2D-NanoUPLC-MS^E em raízes de *A. stenosperma*. A correlação entre a abundância proteica e a expressão do mRNA correspondente (*in silico* e *in vitro*) mostrou que enquanto a dinâmica de resposta ao estresse hídrico foi preferencialmente negativamente regulada em raízes estressadas de *A. duranensis*, em raízes de *A. stenosperma* infectadas com nematoide foi positivamente regulada. Entre as proteínas aqui identificadas, endoquitinase classe II e proteína tipo MLP-34, ambas responsivas à seca e a última responsiva ao ataque do nematoide, foram selecionadas para avaliação quanto ao efeito de sua superexpressão em resposta a esses estresses. A superexpressão dos genes de *AdCht2* e *AdsMLP34* conferiu redução na infecção ocasionada pelos nematoides. No entanto, a superexpressão do gene de *AdCht2*, único gene avaliado sob seca, não atribuiu tolerância a esse estresse. Além disso, este estudo demonstra a utilidade de estudos proteômicos e sua correlação com dados de transcrição, na identificação de genes e reguladores envolvidos na resposta de defesa ao estresse biótico e abiótico em espécies com relativamente poucos recursos genômicos como o *Arachis*. As proteínas identificadas são potencialmente úteis para o melhoramento genético do amendoim cultivado visando a tolerância à seca e a resistência ao ataque de patógenos.

Palavras-chave: *Arachis*, seca, *Meloidogyne*, abordagens ômicas, *Agrobacterium* spp.

ABSTRACT

Many biotic and abiotic factors may limit the productivity and quality of peanut grains, especially considering that this crop is widely cultivated in the semi-arid tropics and by poor farmers. Both drought and root-knot nematodes (RKN – *Meloidogyne* spp.) are problems that affect not only the peanut crop, but also other crops, posing a worldwide threat to agricultural production and food security. Peanut (*Arachis hypogaea*) presents high susceptibility to different environmental stresses and pathogen attacks. On the other hand, its wild relatives show greater adaptability to adverse environments and resistance to numerous phytopathogens, proving to be important sources of resistance alleles to biotic and abiotic stresses for the genetic improvement of peanuts. In this study, proteins obtained from root tissues of both *A. duranensis* plants subjected to the gradual reduction of water in the soil and from *A. stenosperma* plants inoculated with RKN were analyzed, as well as their differential abundance in relation to the profiles of their corresponding transcripts obtained by RNA-seq and RT-qPCR. Using the 2-DE approach, a total of 31 differentially abundant proteins (DAPs) were identified in roots of *A. duranensis* and 21 in roots of *A. stenosperma*. In addition, 222 DAPs were also identified by 2D-NanoUPLC-MS^E analysis on *A. stenosperma* roots. The correlation between protein abundance and the expression of the corresponding mRNA (*in silico* and *in vitro*) showed that while the dynamics of response to water deficit was preferentially negatively regulated in stressed roots of *A. duranensis*, roots of *A. stenosperma* infected with nematoid was positively regulated. Among the proteins identified herein, class II endochitinase and MLP-like protein 34, both responsive to drought and the latter responsive to nematode attack, were selected for evaluation as to the effect of their overexpression in response to these stresses. Overexpression of the *AdCht2* and *AdsMLP34* genes conferred reduction in nematode infection. However, overexpression of the *AdCht2* gene, the only gene evaluated under drought, did not attribute tolerance to this stress. In addition, this study demonstrates the usefulness of proteomic studies and their correlation with transcription data, in the identification of genes and regulators involved in the defense response to biotic and abiotic stress in species with relatively few genomic resources such as *Arachis*. The identified proteins are potentially useful for the genetic improvement of cultivated peanuts aiming at drought tolerance and resistance to pathogen attack.

Keywords: *Arachis*, drought, *Meloidogyne*, omics approaches, *Agrobacterium* spp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> desenhados para os genes que codificam as proteínas identificadas.....	37
Tabela 2 - Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massas em raízes de <i>A. duranensis</i> controle e estressadas pela seca.....	43
Tabela 3 - Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massas a partir de 2-DE de raízes de <i>A. stenosperma</i> controle e inoculadas com <i>M. arenaria</i>	64
Tabela 4 - <i>Primers</i> desenhados para os genes que codificam as proteínas identificadas como diferencialmente abundante.....	71
Tabela Suplementar 1 - Análise de classes com as proteínas diferencialmente abundantes obtidas a partir da comparação entre plantas de <i>Arachis</i> silvestres estressadas e controle fornecidas pelo <i>Image Master 2D Platinum</i> (GE Healthcare).	121
Tabela Suplementar 2 - Análise comparativa entre os dados proteômicos e transcritômicos (<i>in silico</i> e RT-qPCR) obtidos de plantas de <i>A. duranensis</i> durante o estresse hídrico.	122
Tabela Suplementar 3 - Proteínas diferencialmente abundantes de raízes de <i>A. stenosperma</i> controle e inoculadas com <i>M. arenaria</i> , identificadas por 2D-NanoUPLC-MS ^E	125

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Países produtores de amendoim. Divisão (cores) quantidade de produção (em milhões de toneladas – Mt) por país. Imagem adaptada aos dados de USDA/FAS, 2019. 17
- Figura 2** - Distribuição geográfica de todas as espécies do gênero *Arachis* (delimitada pela linha pontilhada) e distribuição das espécies da seção *Arachis* (delimitada em amarelo). Imagem adaptada a partir de Bertoli et al., 2011. 18
- Figura 3** – Imagem ilustrativa do hábito reprodutivo geocárpico apresentado por todas as espécies do gênero *Arachis*. Fonte da imagem modificada: <https://www.fibrasynormasdecolombia.com/terminos-definiciones/nitrogeno-tierra-ciclos-e-importancia/>. 18
- Figura 4** - Esquema ilustrativo do provável evento de cruzamento que resultou a espécie alotetraploide (AABB), *A. hypogaea*. Fonte das imagens das sementes: Leal-Bertoli et al., 2017. 19
- Figura 5** - Esquema simplificado e ilustrativo da resposta desencadeada pela planta ao déficit hídrico. 23
- Figura 6** - Imagem ilustrativa do ciclo de vida do nematoide das galhas. Ao centro, sintomas típicos (galhas) de meloidoginose em raízes de amendoim (<http://site.extension.uga.edu>). Imagem adaptada a partir de Castagone-Sereno et al., 2013. 25
- Figura 7** - Sintomas causados pela infecção por *M. arenaria* em plantas de amendoim. A esquerda um campo de cultivo de amendoim apresentando clorose irregular causada pela infestação do nematoide. A direita, no círculo, sintomas característicos da meloidoginose: presença de galhas nas raízes e vagens. Fonte das imagens: <https://agfax.com/2017/10/02/florida-peanuts-nematode-damage-and-management-decisions/> e <http://oziasakinslab.org/wp-content/uploads/2011/04/Nematode-infected-2.jpg>. 26
- Figura 8** – Plantas de *A. duranensis* submetidas a uma diminuição gradual da água (*dry-down*). A) Taxa de transpiração normalizada (NTR) de plantas de *A. duranensis* durante o experimento de *dry-down*. B-D) Concentração média dos pigmentos fotossintéticos em plantas controle e estressadas (clorofila a, clorofila b e carotenóides) durante o experimento. E-F) Teor relativo de água (TRA) e extravasamento de eletrólitos (EE) em folhas de *A. duranensis* ao final do experimento (quarto dia). G) 1: fenótipo normal da parte aérea de plantas controle de *A. duranensis*. 2: Sintomas nas partes aéreas de plantas *A. duranensis* estressadas, mostrando murcha e evidente dessecação das folhas. 39
- Figura 9** - Mapas comparativos em 2D de raízes de *A. duranensis* sob condições controle e de estresse hídrico mostrando proteínas diferencialmente abundantes. (+) abundância aumentada, (-) abundância diminuída e () proteína exclusivas em ambas as condições. 40
- Figura 10** - Perfil da abundância de 30 proteínas identificadas pela técnica de 2-DE em raízes de plantas de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico (EST) e na condição controle (CTR). Os gráficos representam a variação da abundância diferencial de proteínas (barra azul – determinada pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05) e a expressão diferencial dos genes putativos que codificam essas proteínas (barra laranja – determinada por RT-qPCR). Gráficos sem barras azuis representam proteínas exclusivas das raízes controle (SRPBCC, TMED, Leo-1, HSP70 [*spot* 360], MetE e APRT) ou plantas estressadas (Cht2). 42
- Figura 11** – Mapa de calor de da expressão diferencial do proteoma e transcrito (*in silico* e RT-qPCR) em raízes de *A. duranensis* controle e submetidas à seca. A) Análise de clusterização de proteínas com abundância diferencial e seus mRNAs correspondentes (*in silico* e RT-qPCR). B) Análise de clusterização de proteínas exclusivas e seus correspondentes mRNAs (*in silico* e RT-qPCR). Na escala vermelho-azul, as cores vermelhas mais escuras indicam o gene mais regulado e o azul mais escuro dos genes menos regulados. 50
- Figura 12** - Mapas comparativos em 2D de raízes de plantas de *A. stenosperma* controle (0 DAI) e inoculadas (3, 6 e 9 DAI) com *M. arenaria*, mostrando proteínas diferencialmente abundantes (DAPs $p \leq 0,05$) estatisticamente avaliadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05. 62

- Figura 13** – Perfil de abundância das 21 DAPs identificadas pela técnica de 2-DE em raízes de plantas de *A. stenosperma* inoculadas (3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (0 DAI) com *M. arenaria*. Eixo(Y): representa a abundância relativa (expressa pela % do volume do *spot* determinado pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05), das proteínas identificadas em raízes controles e inoculadas. 63
- Figura 14** - Visão geral de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E e classificadas em 28 categorias funcionais hierarquicamente organizadas (BINS) pela ferramenta de anotação de sequências - Mercator. (*) Categorias funcionais com DAPs também identificadas na análise 2-DE. 67
- Figura 15** - Redes de interações proteína-proteína identificadas a partir de raízes de *A. stenosperma* inoculadas e não inoculadas com *M. arenaria*. 68
- Figura 16** – Diagrama de Venn com a distribuição dos genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR ≤ 0,05) em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (3, 6 e 9 DAI) em relação as raízes não inoculadas (0 DAI) com *M. arenaria*. DAI – dias após a inoculação. Diagrama gerado conforme Heberle et al., 2015. 69
- Figura 17** – Sobreposição de proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E e de genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR ≤ 0,05) por RNA-Seq. 70
- Figura 18** - Visão geral da expressão gênica e abundância proteica de 18 DAPs identificadas em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (INOC - 3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (CTR - 0 DAI) com *M. arenaria*. Os gráficos representam a variação da expressão diferencial dos genes putativos que codificam estas proteínas (mRNA - barras azuis) e a abundância diferencial de proteínas (barra vermelha - determinada por análise 2D-NanoUPLC-MS^E - *Proteína Lynx Global Server - PLGS*) (INOC/ CTR). As barras de erro referem-se às diferenças encontradas entre as replicatas técnicas testadas. 72
- Figura 19** - Mapas dos vetores. A) pPZP_201BK_EGFP. B) pPZP-AdCht2. C) pPZP-MLP34. Imagem criada pelo SnapGene® 79
- Figura 20** - Gráfico de expressão relativa dos genes candidatos selecionados para superexpressão em plantas transgênicas. A esquerda: nível de expressão de *AdCht2* e *AsMLP34* em raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico. A direita: nível de expressão de *AdCht2* e *AsMLP34* em raízes de *A. stenosperma* inoculadas com nematoide. Expressão relativa de mRNA de amostras tratadas (estressada ou inoculada), comparadas às amostras controle. (*) indica significância a 95% ($p \leq 0,05$). 82
- Figura 21** – Gel de agarose (1,5%) com os produtos de amplificação por PCR de colônia para confirmação da transformação das Agrobactérias com os vetores pPZP-AsMLP34 e pPZP-AdCht2, utilizando os primers para os genes de virulência (*VIR* - 338pb), *eGFP* (350pb), *AsMLP34* (198pb) e *AdCht2* (173pb). A) Transformação em *A. rhizogenes* K599. B) Transformação de *A. tumefaciens* GV3101. MM: marcador molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™). M: transformação feita com pPZP-AsMLP34. C: transformação feita com pPZP-AdCht2. 1-3) Três diferentes colônias utilizadas para confirmação da transformação. (+): Controle positivo (plasmídeo). (-): Controle negativo. 83
- Figura 22** - Imagens ilustrativas de raízes transgênicas induzidas por *A. rhizogenes* em folhas de amendoim e o efeito da superexpressão dos genes *eGFP*, *AsMLP34* e *AdCht2* na quantidade de galhas por grama de raiz avaliada. A-C) Folhas destacadas de amendoim com raízes transgênicas em cabeleira observadas na lupa sob luz branca. A'-C') Raízes transgênicas observadas na lupa sob UV. A) Raízes com pPZP-eGFP. B) Raízes com pPZP-AdCht2. C) Raízes com pPZP-AsMLP34. Imagens por Andressa da C. Q. Martins. 83
- Figura 23** - Infecção por *M. arenaria* raça 1 em raízes transgênicas (pPZP-eGFP) induzidas por *A. rhizogenes* a partir de folhas destacadas de *A. hypogaea*, por meio do processo de coloração dos nematoides com fucsina ácida e das massas de ovos com floxina B. (A-B) Juvenis do estágio 2 (J2), corados com fucsina ácida (em rosa), penetrando as raízes transgênicas, 6 DAI. (C-D) Massas de ovos coradas com floxina B (em rosa) em raízes transgênicas, 60 DAI. (C) Galhas sem coloração, representada por intumescimentos em algumas regiões radiculares, 60 DAI. Raízes observadas na lupa sob luz branca. DAI: dias após a inoculação do nematoide. Imagens (A-B) por Andressa da C. Q. Martins e (C-D) por Bruna Medeiros Pereira. 84
- Figura 24** - Gráficos comparativos com o número médio de galhas por grama de raízes transgênicas obtidas a partir de folhas destacadas de amendoim. A) Valores médios obtidos a partir de raízes transformadas

- com pPZP-eGFP e pPZP-AdCht2. B) Valores médios obtidos a partir de raízes transformadas com pPZP-eGFP e pPZP-AsMLP34 (30 folhas destacadas por genes). (*): valor de $p \leq 0,05$ 84
- Figura 25** – Plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AdCht2* submetidas à diminuição gradual de água no solo (*dry-down*). A) Porcentagem média de água no solo durante os 13 dias de experimento de *dry-down*. B) Visão geral do fenótipo da parte aérea de plantas transformadas (*AdCht2*) e não transformadas (Col. 0) ao longo do experimento de *dry-down*. Imagens por Andressa a C. Q. Martins. 86
- Figura 26** - Imagem ilustrativa da diferença observada entre o tamanho da parte aérea das plantas de *A. thaliana*. (A) Plantas não transformadas. B-C) Duas linhagens diferentes de plantas superexpressando o gene *AdCht2*. As sementes de todas essas plantas foram colocadas para germinar no mesmo dia e sob as mesmas condições. Imagem por Andressa da C. Q. Martins. 88
- Figura Suplementar 1** – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico. Controle (NTR: 1,0); Estressado (NTR < 0,3)..... 120
- Figura Suplementar 2** - Visão geral da categorização funcional, usando a ferramenta de anotação de sequência Mercator, das 31 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) identificadas em raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico. 120
- Figura Suplementar 3** – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de *A. stenosperma* não inoculada (0 DAI) e inoculadas com *M. arenaria* (3, 6 e 9 DAI). DAI – dias após a inoculação..... 124

INTRODUÇÃO GERAL

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma cultura de importância alimentar pois seus grãos além de possuírem alto teor nutricional, podem ser consumidos industrializados ou *in natura*. Cultivado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, é a quinta oleaginosa mais produzida no mundo. No entanto, apesar da grande variabilidade morfológica apresentada entre as diferentes cultivares de *A. hypogaea* (alotetraploide AABB), esta espécie apresenta alta suscetibilidade aos estresses bióticos e abióticos o que pode afetar drasticamente sua produtividade, e uma baixa diversidade genética, dificultando a aplicação de abordagens de melhoramento molecular. Por outro lado, seus parentes silvestres diploides apresentam maior variabilidade genética e, portanto, maiores níveis de resistência a vários estresses, constituindo assim, uma potencial fonte de alelos de resistência a doenças e à adaptação a diversos ambientes.

Dentre os parentes silvestres do amendoim do genoma AA, *A. duranensis*, originária de regiões com poucas chuvas, apresenta maior tolerância à seca, exibindo um perfil de transpiração mais conservativo que a espécie cultivada, enquanto que *A. stenosperma* apresenta resistência a vários patógenos, incluindo o nematoide das galhas (*Meloidogyne arenaria* raça 1), observada por meio de reação de hipersensibilidade. Desta forma, ambos os genótipos são interessantes para a descoberta de genes relacionados à tolerância à seca e resistência ao nematoide.

Ao longo dos últimos anos, a utilização de estratégias de sequenciamento massal do transcrito e de identificação massal de proteínas têm possibilitado a identificação e seleção de novos genes/proteínas candidatos, possivelmente envolvidos nas respostas de defesa aos estresses, em diferentes espécies de *Arachis*. Além disso, métodos de avaliação da expressão de genes por PCR em tempo real (ou PCR quantitativo – qPCR), e da sua função *in planta*, pela produção de plantas transgênicas ou raízes transgênicas a partir de folha destacada de *A. hypogaea*, têm possibilitado uma melhor percepção a cerca da função biológica destes genes, bem como auxiliado na elucidação das vias metabólicas envolvidas na tolerância à seca e na resistência ao ataque de patógenos.

Este estudo compreende três capítulos. Os dois primeiros capítulos versam sobre a identificação de proteínas diferencialmente abundantes a partir de raízes de *A. duranensis* submetidas à diminuição gradual de água no solo e a partir de raízes de *A. stenosperma* inoculadas com nematoide das galhas e comparação da abundância proteica com dados transcritômicos obtidos anteriormente (RNA-Seq) e pela análise *in vitro* por RT-qPCR para identificação de potenciais genes candidatos envolvidos na resposta de defesa ao estresse. O terceiro capítulo descreve os efeitos da superexpressão dos genes candidatos selecionados mediante ao ataque do nematoide e/ou ao déficit hídrico.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. O amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

O amendoim é uma leguminosa endêmica da América do Sul, mas assim como várias outras culturas, tornou-se mais importante em regiões do mundo longe do seu país de origem (Bertioli et al., 2011). Cultivada em mais de 100 países nos seis continentes e com projeção de produção anual (2018/2019) de quase 42 milhões de toneladas (Nwokolo, 1996; USDA-FAS, 2019a), a maior produção de amendoim ocorre na Ásia e na África. Atualmente, China, Índia, Nigéria, Estados Unidos e Sudão são os cinco maiores produtores de amendoim, com o Brasil ocupando a 12ª posição (Figura 1) (USDA-FAS, 2019b). O estado de São Paulo é o maior produtor nacional de amendoim (Conab, 2019).

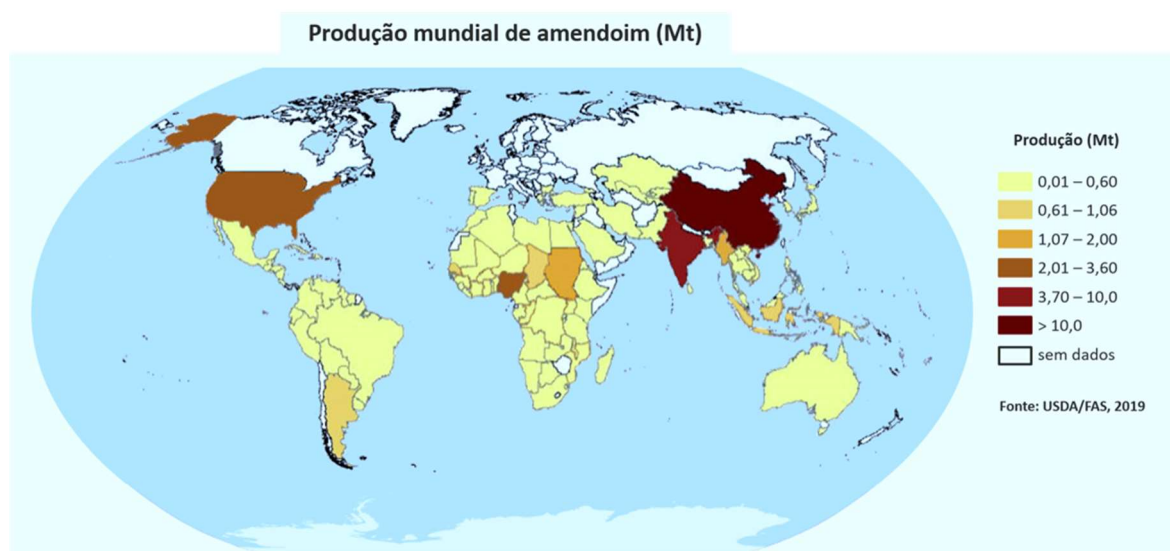


Figura 1 – Países produtores de amendoim. Divisão (cores) quantidade de produção (em milhões de toneladas – Mt) por país. Imagem adaptada aos dados de USDA/FAS, 2019.

Os grãos de amendoim, podem ser industrializados ou consumidos, também, *in natura*. São ricos em ácidos graxos poli-insaturados, que exercem inúmeros benefícios à saúde, e são uma excelente fonte de energia, proteínas, vitaminas, minerais e fitonutrientes como resveratrol, isoflavonóides, ácidos fenólicos e fitoesteróides (Toomer, 2017). Dessa forma, são úteis como suplemento de proteínas na produção de alimentos enriquecidos, demonstrando um grande potencial no combate à fome e desnutrição em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Singh e Singh, 1991; Janila et al., 2016; Mupunga et al., 2017).

1.2.O gênero *Arachis* e o uso de espécies silvestres no melhoramento genético do amendoim

Apesar da grande dispersão mundial da espécie cultivada (*A. hypogaea*), o gênero *Arachis* é originário da América do Sul com distribuição natural restrita à Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Figura 2) (Singh e Simpson, 1994). O gênero pertence à família Fabaceae e se distingue dos demais pelo fato de todas as suas espécies possuírem hábito reprodutivo geocárpico, onde a flor é aérea e o fruto é subterrâneo (Figura 3) (Smith, 1950).



Figura 2 - Distribuição geográfica de todas as espécies do gênero *Arachis* (delimitada pela linha pontilhada) e distribuição das espécies da seção *Arachis* (delimitada em amarelo). Imagem adaptada a partir de Bertoli et al., 2011.

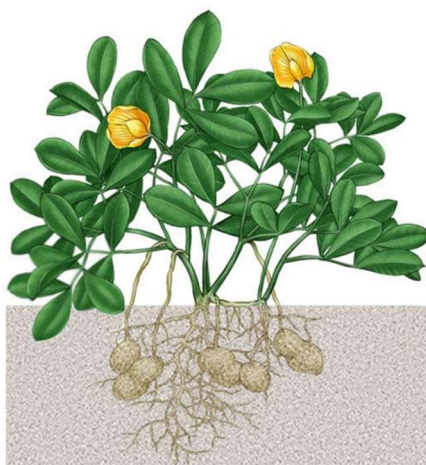


Figura 3 – Imagem ilustrativa do hábito reprodutivo geocárpico apresentado por todas as espécies do gênero *Arachis*. Fonte da imagem modificada: <https://www.fibrasynormasdecolumbia.com/terminos-definiciones/nitrogeno-tierra-ciclos-e-importancia/>.

O gênero *Arachis* possui 82 espécies descritas até o momento, que de acordo com a sua morfologia, compatibilidade de cruzamento, viabilidade de híbridos, distribuição

geográfica e citogenética têm sido divididas em nove seções taxonômicas (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides* e *Triseminatae*) (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005; Bertoli et al., 2011; Valls et al., 2013; Santana e Valls, 2015). A seção *Arachis* é a maior, com 32 espécies incluindo a espécie domesticada, *A. hypogaea*. É ainda considerada a mais diversificada, porquê além de abrigar espécies anuais e perenes, de estrutura de cariótipos (A, B, D, F e K) e de números de cromossomos (18, 20 e 40), possui uma vasta distribuição geográfica, com espécies exclusivas do Brasil e de interesse para o melhoramento genético (Krapovickas e Gregory, 1994; Valls e Simpson, 2005, Lavia et al., 2009; Bertoli et al., 2011; Moretzsohn et al., 2013).

As espécies tetraploides têm quatro conjuntos cromossômicos (AABB) e surgiram, provavelmente de um eventual cruzamento entre duas espécies diploides (AA x BB), gerando um híbrido estéril (AB) que, posteriormente, teve sua fertilidade restaurada a partir de um evento natural de duplicação cromossômica, o que as levou a um isolamento reprodutivo de seus demais parentes silvestres (Figura 4) (Krapovickas e Gregory, 1994; Kochert et al., 1996; Seijo et al., 2004; Bertoli et al., 2011).

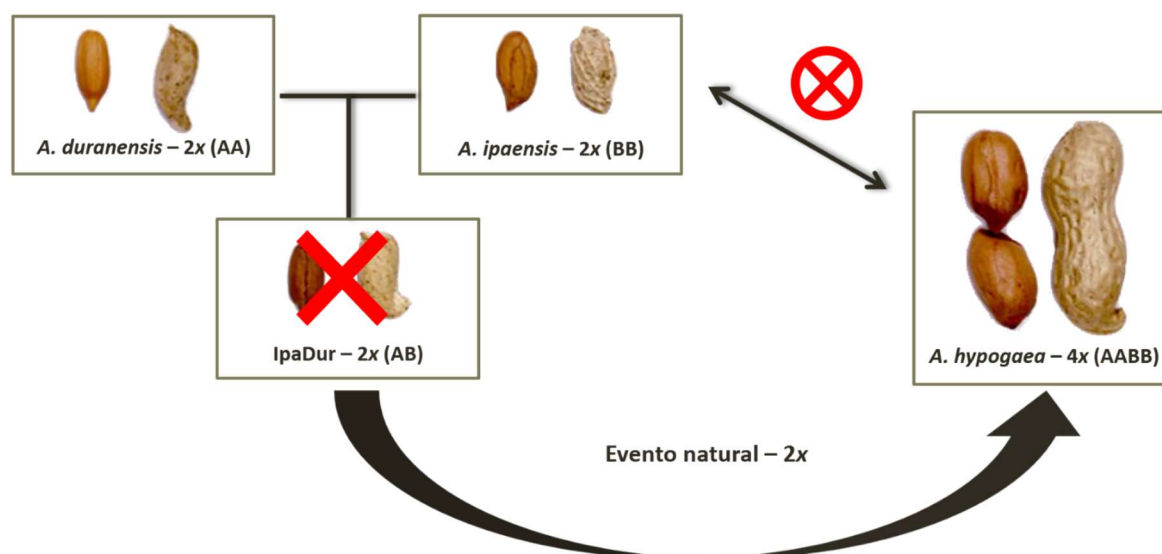


Figura 4 - Esquema ilustrativo do provável evento de cruzamento que resultou a espécie alotetraploide (AABB), *A. hypogaea*. Fonte das imagens das sementes: Leal-Bertoli et al., 2017.

Quando comparada aos seus parentes silvestres, que no decorrer de sua evolução tiveram que se adaptar a uma variedade de ambientes e estresses bióticos, *A. hypogaea* possui estreita base genética em relação a caracteres agrônômicos e alta suscetibilidade aos estresses abióticos e ao ataque de pragas e fitopatógenos (Kochert et al., 1991; Young et al., 1996; Moretzsohn et al., 2004; Seijo et al., 2004, 2007; Fávero et al., 2006; Moretzsohn et al., 2013; Bertoli et al., 2016).

Investigações acerca da variabilidade genética entre as espécies silvestres de *Arachis* quanto à tolerância ao estresse biótico e abiótico têm sido reportadas. Nautiyal e colaboradores (2008) e Leal-Bertioli e colaboradores (2012), identificaram diferentes acessos de espécies silvestres mais tolerantes ao estresse térmico (calor e frio) e ao déficit hídrico, respectivamente, do que a espécie cultivada. Além disso, na revisão feita por Stalker (2017) é possível verificar a variedade de espécies silvestres com altos níveis de resistências à diferentes pragas e doenças causadas por fungos, vírus e nematoides.

Com isso, muitos pesquisadores têm concentrado seus estudos no germoplasma silvestre de *Arachis*, especialmente as espécies diploides dos genomas 'A' e 'B' da seção *Arachis*, a fim de identificar novas fontes de alelos de resistência para introgressão (Singh e Moss, 1984; Simpson, 1991; Garcia et al., 1996; Burow et al., 2009; Guo et al., 2012; Kumari et al., 2014).

Há várias coleções de germoplasma de amendoim pelo mundo (Índia, China, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Bolívia, dentre outros) (Upadhyaya et al., 2001; Holbrook, 2001; Stalker et al., 2016). No entanto, o maior banco de germoplasma silvestre do mundo está situado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa-CENARGEN, Brasília-DF), com mais de 1200 acessos, representando todas as espécies descritas até o momento (Stalker, 2017), podendo ser explorado visando o melhoramento genético do amendoim.

1.3. *Arachis duranensis* e *Arachis stenosperma* Krapov. e W. C. Gregory

Arachis duranensis e *A. stenosperma* são espécies diploides ($2n=2x=20$) do genoma 'A', pertencentes a seção *Arachis* (Stalker e Dalmacio, 1981; Fernández e Krapovickas, 1994; Krapovickas e Gregory, 1994; Moretzsohn et al., 2004; Seijo et al., 2004; Custódio et al., 2005; Moretzsohn et al., 2013).

Arachis duranensis é um dos genitores do amendoim cultivado (Bertioli et al., 2016). Essa espécie é originária de regiões com poucas chuvas e apresenta maior tolerância à seca, exibindo um perfil de transpiração mais conservativo que a espécie cultivada, em especial, o acesso K7988 (Leal-Bertioli et al., 2012; Brasileiro et al., 2015; Vinson et al., 2018). Já *A. stenosperma*, além de ser sexualmente compatível com *A. duranensis* (Moretzsohn et al., 2005), apresenta resistência a inúmeras pragas e fitopatógenos (insetos, fungos, vírus e nematoides) (Fávero et al., 2009; Michelotto et al., 2015; Stalker, 2017), incluindo o nematoide das galhas (*Meloidogyne arenaria*), por meio de reação de hipersensibilidade, em particular, o acesso V10309 (Proite et al., 2008). Diante disso, ambos os genótipos demonstram ser fontes de resistência, não somente para o programa de melhoramento do amendoim, como também para a descoberta de genes candidatos

que conferem tolerância à seca e resistência à fitopatógenos. Com esse intuito, estudos transcritômicos e, agora proteômicos, têm sido desenvolvidos tanto com raízes de *A. duranensis* (acesso K7988) submetidos à diminuição gradual de água no solo ou à secagem ao ar (pela retirada das plantas da solução hidropônica) (Guimarães et al., 2012; Brasileiro et al., 2015; Vinson et al., 2018), quanto com raízes de *A. stenosperma* (V10309) (Guimarães et al., 2005, 2010, 2015; Proite et al., 2007).

1.4. Principais fatores responsáveis pela redução da produtividade

Muitos fatores abióticos (calor, seca, frio e salinidade) e bióticos (vírus, fungos, bactérias e nematoides) podem limitar a produtividade e qualidade das sementes de amendoim, sobretudo, se levar em consideração que esta cultura é amplamente cultivada nos trópicos semiáridos e por agricultores com poucos recursos (Dwivedi et al., 2014).

A seca e alta salinidade são os principais estresses abióticos que limitam a produtividade do amendoim nesta região (Banavath et al., 2018), assim como *Meloidogyne arenaria*, o nematoide das galhas do amendoim, é considerado um dos mais importantes patógenos de solo que também afetam a cultura do amendoim (Yuan et al., 2018).

Tanto a seca quanto os nematoides das galhas são problemas que, no geral, afetam mundialmente as culturas, representando uma ameaça à produção agrícola e segurança alimentar.

1.5. Seca

A seca é um problema mundialmente importante. Trata-se de um dos principais e mais prevalentes fatores de estresse para a planta, influenciando negativamente o crescimento e desenvolvimento de diversas culturas (Zlatev e Lidon, 2012; Varshney et al., 2018). Até o final do século 21, estima-se que as áreas terrestres secas irão redobrar (Deeba et al., 2012). Diante disso, um dos desafios principais à agricultura global é o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca. Para isso, faz-se necessário o entendimento dos mecanismos sistemáticos associados à resposta à seca (Wu et al., 2017).

Como a disponibilidade de água no solo afeta primeiramente as raízes das plantas, as quais são responsáveis pela homeostase celular, mantida pela absorção e distribuição de água e nutrientes para os demais órgãos da planta (Cao et al., 2017; Ghatak et al., 2016). Dessa forma, a arquitetura do sistema radicular, tornou-se alvo de programas de melhoramento (de Dorlodot et al., 2007).

O déficit hídrico induz alterações nos componentes celulares e bioquímicos, levando à ativação e supressão de genes e, conseqüentemente, à modulação de proteínas

envolvidas no estresse (Katam et al., 2016). O estresse sob a planta inteira desencadeia a produção de ácido abscísico (ABA) que, acumulado em maior quantidade nas raízes, é transportado para as células guardas, na parte aérea da planta, via xilema, causando o fechamento estomático e minimizando a perda de água por transpiração. Isso reduz a absorção de carbono por fotossíntese e, por consequência, o rendimento da produção vegetal (Figura 5) (Mittler e Blumwald, 2015; Leng e Hall, 2019).

No entanto, Hu e colaboradores (2016) verificaram que o padrão de biossíntese e acúmulo de ABA em plantas de amendoim (*A. hypogaea*) era órgão-estresse-dependente, sendo mais pronunciado no órgão submetido ao estresse (folha ou raiz). Porém, no caso do amendoim, independente do local de acúmulo de ABA esse fitormônio era transportado para as folhas, induzindo o fechamento estomático, por meio do sistema vascular, que parece regular o acúmulo de ABA nos órgãos da planta (Hu et al., 2016).

Os efeitos do ABA, como troca iônica, reorganização do citoesqueleto, produção de metabólitos, modulação da expressão gênica e modificações pós-traducionais, parecem ser produzidos por meio da interação com outras vias de fitormônios, como a do ácido jasmônico (JA) (Tuteja e Sopory, 2008; Sarwat e Tuteja, 2017). Além disso, o ABA pode causar acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mittler e Blumwald, 2015). Essas ROS são moléculas sinalizadoras, alertando o estresse de forma sistêmica. Interação com outras vias responsivas, como de sinalização de Ca^{2+} , de hormônio e de cascatas quinases, atenuando os efeitos do estresse oxidativo e aclimatando as plantas ao estresse hídrico (Mittler et al., 2011; Kissoudis et al., 2014; Suzuki et al. 2013) (Figura 5).

Além de ABA e JA, o ácido salicílico (SA) também tem sido implicado como responsivo ao déficit hídrico (Pavlović et al., 2018), aumentando, inclusive, a estabilidade do aparato fotossintético (Gururani et al., 2015).

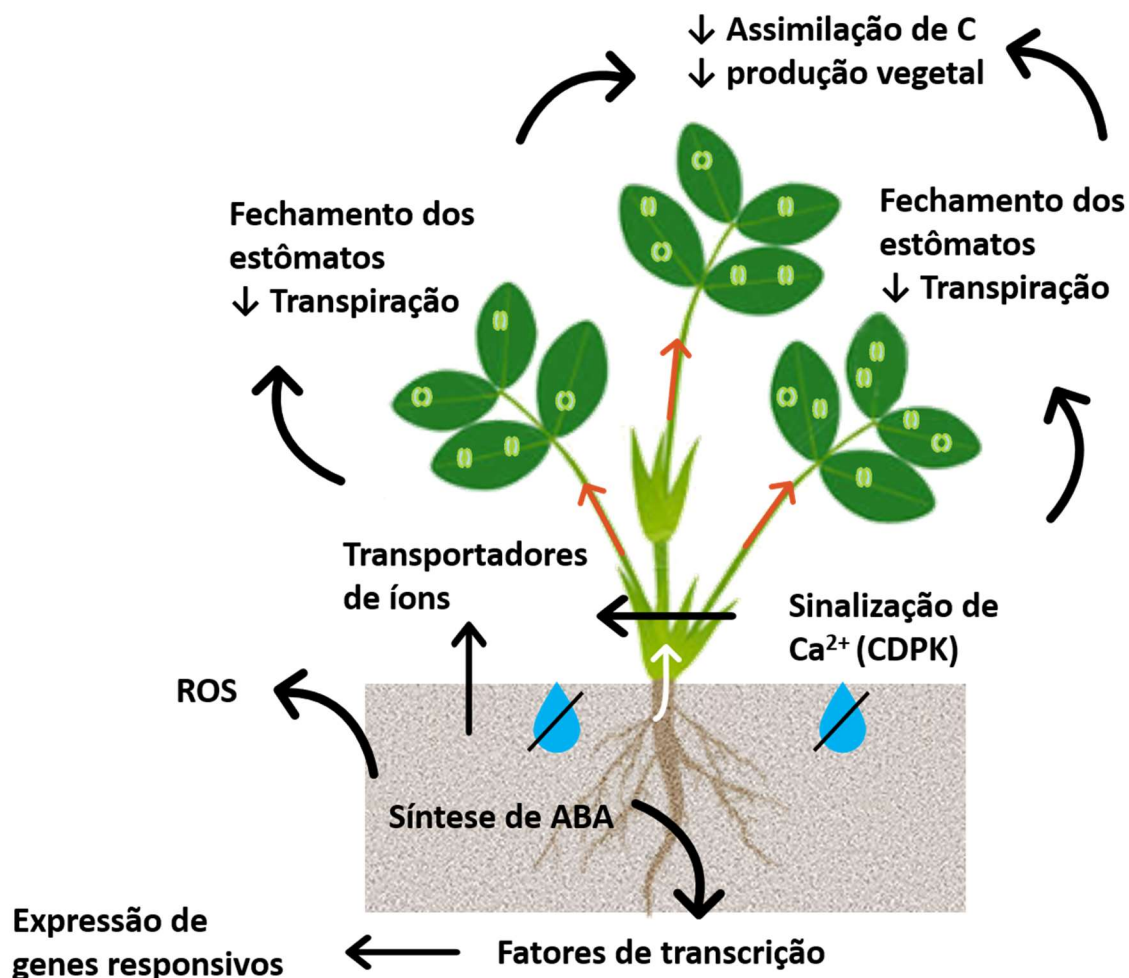


Figura 5 - Esquema simplificado e ilustrativo da resposta desencadeada pela planta ao déficit hídrico.

Considerando que os mecanismos moleculares e fisiológicos de tolerância ao déficit hídrico são complexos, e envolvem a sobrevivência em baixas condições hídricas, mantendo o turgor celular e evitando a perda de água por evaporação por meio do acúmulo de solutos (Ingram e Bartels, 1996), várias mudanças de expressão gênica são esperadas e levam a modulação de proteínas envolvidas no estresse. A análise deste fenômeno em diferentes níveis ômicos torna-se necessária para melhor compreendê-los. Isto porque, a maioria dos processos celulares são regulados por atividades enzimáticas e interações proteína-proteína, que podem não ser identificados apenas em estudos transcritômicos.

Como as respostas de tolerância são genótipo-estresse específicas, as estratégias de melhoramento para manutenção ou o aumento de produtividade de culturas sob condições de seca variam de acordo com o ambiente de cultivo.

O desenvolvimento de cultivares com maior resistência à seca e maior eficiência no uso da água tem sido almejado (Sharma e Lavanya, 2002). Com isso, estudos na área transcritômica e proteômica têm sido desenvolvidos em busca de genes candidatos envolvidos na resposta ao déficit hídrico. No entanto, esse é um difícil trabalho devido as

complexas redes de interação para resposta à seca, bem como a especificidade de adaptação e resposta de resistência, genótipo-local, necessárias para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes à seca.

1.6. Nematóide das galhas

Outro fator limitante ao cultivo e produtividade do amendoim é a infecção ocasionada pelos nematoides das galhas, que pertencem ao gênero *Meloidogyne* e é um dos principais fitonematoídeos do mundo. São endoparasitas sedentários obrigatórios capazes de infectar praticamente qualquer espécie de planta vascular e estão dispersos no mundo inteiro (Trudgill e Blok, 2001). Embora existam cerca de 100 espécies descritas (Jones et al., 2013; Archidona-Yuste et al., 2018), a maioria das pesquisas concentra-se em quatro principais espécies: *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood (de regiões tropicais) e *M. hapla* Chitwood (de região temperada), as quais são responsáveis por grande parte dos danos às culturas, e portanto, as mais economicamente importantes (Elling, 2013).

O ciclo de vida completo dos nematoides das galhas leva de três a seis semanas, dependendo da espécie e das condições ambientais. A patogênese de *Meloidogyne* spp. começa com a disseminação de ovos do nematoide no solo (o primeiro estágio de desenvolvimento de juvenis, J1, ocorre ainda dentro do ovo) que eclodem como juvenis de segundo estágio de desenvolvimento (J2, estágio infectivo). Durante uma interação compatível os J2 invadem a raiz, preferencialmente pela sua zona de alongamento, e migram intercelularmente em direção ao cilindro vascular, onde estabelecem o sítio de alimentação com a formação das células gigantes. No sítio de alimentação, o nematoide passa pela segunda, terceira e quarta ecdises (J3, J4 e estágio maduro quando se diferenciam em fêmeas ou machos). As fêmeas tornam-se sedentárias até o seu amadurecimento, formação e liberação de ovos na superfície radicular em uma matriz gelatinosa protetora, enquanto que os machos não se alimentam e retornam ao solo. As células adjacentes às células gigantes sofrem distúrbio hormonal (hiperauxina), levando a hiperplasia e hipertrofia das mesmas, dando origem as galhas (Figura 6).

A atividade metabólica nas células gigantes mobiliza produtos fotossintéticos dos brotos e nutrientes das raízes atuando como um dreno metabólico para a promoção do desenvolvimento e reprodução dos nematoides. Em consequência, interferem no processo de desenvolvimento e crescimento da planta, ocasionando um crescimento lento e/ou atrofiado, murcha, descoloração foliar, deformação radicular, podridão das raízes, acarretando a diminuição do rendimento de produção (Wyss et al., 1992; von Mende, 1997;

Guimarães et al., 2005; Caillaud et al., 2008; Bird et al., 2009; Castagnone-Sereno et al., 2013; Elling, 2013; Jones e Goto, 2011; Jones et al., 2013; Escobar et al., 2015).

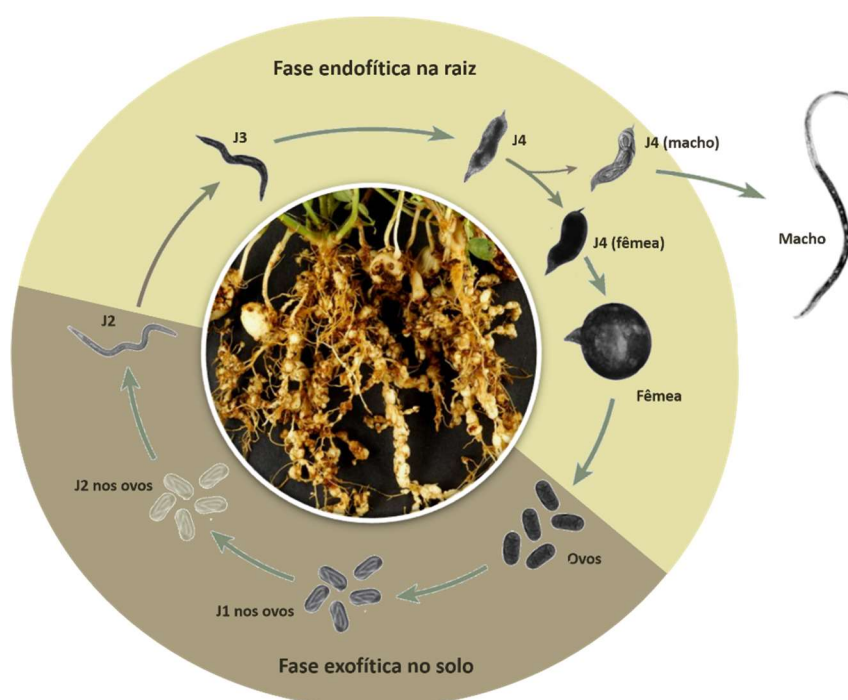


Figura 6 - Imagem ilustrativa do ciclo de vida do nematoide das galhas. Ao centro, sintomas típicos (galhas) de meloidoginose em raízes de amendoim (<http://site.extension.uga.edu>). Imagem adaptada a partir de Castagnone-Sereno et al., 2013.

Condições ambientais, tipo de solo, densidade populacional de nematoides no solo, espécie e cultivar vegetal podem influenciar não somente a reação da planta ao parasitismo, como também a severidade dos danos às culturas infectadas (Rhaman, 2003; Jones et al., 2013). Esses nematoides são, geralmente, dispersos por mudas de plantio, tubérculos e plantas jovens já infectadas, por ferramentas e maquinarias de cultivo, animais e sistema de irrigação. Sem esses agentes de propagação, a dispersão dos nematoides é limitada a poucos centímetros dentro do mesmo campo de cultivo (Rhaman, 2003).

A maior dificuldade é diminuir a densidade populacional do nematoide no solo. Para isso, estratégias de controle têm sido empregadas, como o uso de químicos (nematicidas e fumigantes), agente antagonistas ao nematoide (controle biológico com uso de fungos e bactéria), métodos físicos (como solarização), rotação de cultura e uso de plantas resistentes (Escobar et al., 2015). O desenvolvimento de novas estratégias sustentáveis para controlar nematoides das galhas é dificultada pela falta de compreensão do parasitismo desses nematoides em nível molecular, de forma que o entendimento de como as plantas hospedeiras percebem e respondem ao parasitismo é importante para o desenvolvimento de cultivares que tenham resistência eficaz contra nematoides das galhas, sem que sua produtividade seja prejudicada (Goto et al., 2013; Dihn et al., 2014).

1.7. Nematóide das galhas no amendoim

As espécies *Meloidigyne javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* e *M. haplanaria* são as que acometem a cultura do amendoim (Tomaszewski et al., 1994; Motsinger et al., 1976; Eisenback et al., 2003). Sendo, *M. arenaria* raça 1 a espécie mais prevalente nos campos de cultivo de amendoim (Burow et al., 1996; Sharma et al., 1999), causando crescimento atrofiado, murcha, descoloração foliar, deformação radicular e podridão dos ginóforos, vagens e raízes (Figura 7).



Figura 7 - Sintomas causados pela infecção por *M. arenaria* em plantas de amendoim. A esquerda um campo de cultivo de amendoim apresentando clorose irregular causada pela infestação do nematóide. A direita, no círculo, sintomas característicos da meloidoginose: presença de galhas nas raízes e vagens. Fonte das imagens: <https://agfax.com/2017/10/02/florida-peanuts-nematode-damage-and-management-decisions/> e <http://oziasakinslab.org/wp-content/uploads/2011/04/Nematode-infected-2.jpg>.

Dentre as estratégias de controle de nematóides das galhas nas culturas de amendoim estão: a) utilização de nematicidas, que por muitas vezes são ineficientes e prejudiciais a saúde e ao meio ambiente; b) rotação de cultura, realizadas com espécies não hospedeiras, como algumas gramíneas como grama-bahia, grama-bermuda e sorgo e com algodão; e c) o uso de cultivares resistentes (Grabau e Dickson, 2018).

Em 1999, duas cultivares comerciais de amendoim resistentes a *M. arenaria* e *M. javanica*, NemaTAM e COAN, foram lançadas. Essas cultivares foram originadas por meio da introgressão de genes de resistência da espécie silvestre *A. cardenasii*, seguida de diversos retrocruzamentos com a variedade comercial Florunner (Simpson e Starr, 2001; Simpson et al., 2003). Já em 2007 a cultivar Tifguard, resistente ao TSWV (*tomato spotted wilt tospovirus*) e a *M. arenaria*, obtida a partir do cruzamento entre a cultivar C-99R (resistente ao TSWV) e a cultivar COAN foi lançada (Holbrook et al., 2008a). Até o momento, todas as cultivares comerciais de amendoim possuem a mesma fonte de

resistência oriunda de *A. cardenasii*, reforçando, portanto, a necessidade de desenvolvimento de novas variedades contendo fontes de resistência alternativas.

1.8. Interação planta-*Meloidogyne* spp.

Nematoides endoparasitas sedentários interagem com seus hospedeiros de maneira sutil e especializada (Barcala et al., 2010). O processo de infestação dos nematoides das galhas, comparado a de outros nematoides, pode ser considerado uma interação menos destrutiva às raízes vegetais, uma vez que o nematoide necessita secretar componentes específicos para indução do seu sítio de alimentação e formação das células gigantes (Jones et al., 2011).

Durante a interação planta-*Meloidogyne*, as células do hospedeiro são capazes de responder a presença do nematoide pela percepção da invasão, movimentação e lesão ocasionada à planta. Isso ocorre por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) localizados na superfície das células hospedeiras que reconhecem de elicitores microbianos, conhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno/nematoide/danos celulares (PAMPs/NAMPs/DAMPs), como proteínas, lipídeos, carboidratos e fragmentos de parede celular (Holbein et al., 2016; Ali et al., 2018).

A percepção de PAMPs/DAMPs pelos PRRs desencadeia uma resposta de defesa chamada de imunidade desencadeada pelo patógeno (PTI), associada à detecção e impedimento da entrada do patógeno, e que está associada a respostas intracelulares que incluem o rápido fluxo de íons através da membrana plasmática, ativação de proteínas quinases associadas a mitógenos e dependente de cálcio (MAPKs e CDPKs), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), rápidas mudanças na expressão gênica e reforço da parede celular (Jones e Dangl, 2006; Zipfel, 2008).

Ainda assim, existem patógenos que conseguem escapar desse reconhecimento ou suprimir a resposta de PTI por meio de secreção de efetores de virulência. Dessa forma, outra estratégia da planta para impedir o progresso do nematoide é por meio da imunidade desencadeada por efetores (ETI), o que envolve a percepção de de efetores mediada por receptores intracelulares, que são em sua maioria proteínas multi-domínios com um domínio central conservado de ligação ao nucleotídeo (NB) e um domínio variável rico em repetições de leucina (LRR), codificadas por genes de resistência (genes R). Estas proteínas induzem respostas qualitativamente similares às de PAMPs, porém quantitativamente mais fortes e mais duradouras, resultando em diferentes respostas de defesa e redes de sinalização, caracterizadas por reação de hipersensibilidade (HR) (Zipfel, 2008; Dodds e Rathjen, 2010; Monaghan e Zipfel, 2012; Lannoo e Van Damme, 2014; Berne e Javornik, 2016; Holbein et al., 2016).

Apesar de fontes quantitativas de resistência ao nematoide das galhas terem sido encontradas no amendoim (*A. hypogaea*), uma resistência mais forte, como a exibida pela reação de hipersensibilidade (HR), só foi identificada em espécies diploides, como *A. cardenasii* e *A. stenosperma* (Bendezu e Starr, 2003; Proite et al., 2008).

O entendimento dessas respostas de defesa da planta durante a infecção é importante para definir os processos que governam as interações planta-nematoide (Escobar et al., 2011) e ampliar as fontes de resistências no amendoim, assegurando uma maior durabilidade da resistência (Guimarães et al., 2015).

1.9. Abordagens “ômicas” para o estudo de genes associados a resposta de defesa da planta

O crescente número de sequenciamento genômico de plantas, inclusive dos genitores do amendoim (*A. duranensis* e *A. ipaënsis*) (Bertioli et al., 2016), possibilitou o aprofundamento de estudos de processos biológicos relacionados à fisiologia, crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses em nível celular. Usando-se abordagens ômicas, incluindo genoma, transcrito, proteoma e metaboloma em um único conjunto de dados possível detectar genes e proteínas associados à resposta de defesa da planta a estresses (Agrawal et al., 2015; Zhou et al., 2016).

A utilização de técnicas de sequenciamento do transcrito (RNA-Seq) de espécies silvestres de amendoim visando à busca de genes de tolerância à seca e resistência ao nematoide das galhas possibilitou a identificação de um grande número de genes candidatos envolvidos nas respostas a esses estresses (Guimarães et al., 2010; Guimarães et al., 2012), bem como uma visão geral da expressão gênica durante estágios iniciais do estresse (Brasileiro et al., 2015; Guimarães et al., 2015; Vinson et al., 2018).

Recentemente, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa CENARGEN) construiu um banco de dados de sequências genômicas expressas de diferentes espécies de amendoim silvestre (<http://lbi.cenargen.embrapa.br/arachis/>) submetidos a estresses abióticos e bióticos. No entanto, a função biológica da grande maioria desses genes permanece desconhecida, assim como os mecanismos de controle genético das principais características agrônômicas de interesse. Nesse cenário, a identificação da função biológica desses genes e do produto final traduzido dos mesmos, se torna o maior gargalo e o grande desafio para que se possa agregar valor à informação gerada pelos projetos anteriores.

Associada aos dados de transcrito, a análise proteômica revela os produtos da expressão gênica da planta sob determinada condição de estresse e seu estado fisiológico.

Trata-se de uma abordagem direta para definir a função de genes (Kumar e Kirti, 2015b), auxiliando a compreensão do genótipo-fenótipo observado (Agrawal et al., 2015).

Além do mais, se faz necessária a análise da expressão destes genes/proteínas *in planta*. Somente genes comprovadamente de interesse devem ser introduzidos nas plantas-alvo devido à dificuldade do estabelecimento de um método eficaz de transformação para avaliação da função biológica em amendoim de novos genes candidatos à resistência. Uma alternativa a transformação estável de plantas é o uso de *A. rhizogenes*, bactéria causadora da formação de raiz em cabeleira. A simplicidade e eficiência desse método de transformação tem favorecido sua aplicação em estudos de genes que conferem tolerância à seca e resistência ao nematoide em amendoim (Chu et al., 2014; Liu et al., 2016; Guimaraes et al., 2017).

Em um recente levantamento, Kourelis e van der Hoom (2018) identificaram que 314 genes de resistência (genes R), a partir de várias espécies de planta, foram clonados até o momento. Esses dados sugerem mecanismos de defesa distintos, subdivididos em dois grupos: genes R envolvidos na percepção e genes R envolvidos na perda de suscetibilidade. E ao contrário do que se pensava, a maioria desses mecanismos são aplicados contra diferentes tipos de patógenos e parecem ser universalmente usados no reino vegetal. No entanto, menos da metade dos genes R já clonados (41%) tem mecanismo de ação proposto (Kourelis e van der Hoom, 2018). Muitos genes R ativam a resposta de imunidade desencadeada por efetor que envolve a reação de hipersensibilidade (HR) e morte celular programada (Jones e Dangl, 2006), que pode desencadear a resposta sistêmica adquirida (SAR). Com poucas horas após a HR, as plantas iniciam a produção de diferentes proteínas relacionadas a patogênese (PRs) local e sistematicamente em toda a planta (Maleck e Dietrich, 1999). Com isso, as PRs mostram-se associadas a HR e ao SAR prevenindo o desenvolvimento da infecção (Jain e Khurana, 2018).

Não somente os genes de resistência, mas também genes possivelmente envolvidos na resposta de defesa da planta, uma vez caracterizados e isolados, poderão ser utilizados na obtenção da resistência durável por meio de duas estratégias: a) piramidização de alelos de resistência utilizando seleção assistida por marcadores (SAM). Essa estratégia possibilitará que os genes que são efetivos contra todos os isolados de um patógeno ou algum estresse combinado possam ser acumulados em um único genótipo, possibilitando selecionar recombinações raras entre genes fortemente ligados; b) introgressão de pirâmides gênicas via transgenia. Nesse caso, múltiplos genes associados a resposta de defesa da planta são clonados em um T-DNA que, após transformação seriam selecionados como uma única unidade Mendeliana. A grande vantagem da piramidização de genes é que exige que grandes modificações ocorram no patógeno para

que o mesmo possa vir a quebrar a resistência da hospedeira, contribuindo, portanto, para uma resistência durável contra um determinado patógeno ou estresse durante um estresse combinado.

Interessantemente, vários estudos estão fornecendo evidências da sobreposição das respostas de defesa entre o estresse biótico e abiótico (Miller et al., 2017). Desta forma, aprofundar o conhecimento quanto às respostas de defesa da planta aos estresses biótico e abiótico é desejável para o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes e resistentes, sobretudo, levando-se em consideração que na natureza e nos campos de cultivos, os estresses costumam ocorrer simultaneamente.

OBJETIVOS

1. Geral

Identificar genes candidatos a partir de espécies silvestres de *Arachis* associados à resposta de defesa à seca e ao ataque do nematoide das galhas (*Meloidogyne arenaria*).

2. Específicos

- a) Analisar o transcrito e o proteoma de raízes de *A. duranensis* submetidas a diminuição gradual de água no solo e de raízes de *A. stenosperma* infectadas com *M. arenaria* raça 1;
- b) Identificar genes/proteínas diferencialmente responsivos à diminuição gradual de água no solo e ao ataque do nematoide;
- c) Comparar os dados proteômicos com os dados transcritômicos (RNA-Seq);
- d) Avaliar por meio de RT-qPCR a expressão diferencial dos genes-candidatos selecionados;
- e) Avaliar *in planta* os efeitos da superexpressão de um gene-candidato selecionado à tolerância à seca e outro de resistência a *M. arenaria*, por meio da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de plantas de *Arabidopsis thaliana* e da transformação mediada por *A. rhizogenes* de folhas destacadas de *A. hypogaea*.

CAPÍTULO 1

Proteômica comparativa e análise da expressão gênica em *Arachis duranensis* revelam proteínas de resposta ao estresse associadas à tolerância à seca

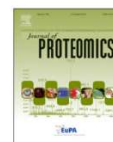
Journal of Proteomics 192 (2019) 299–310



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot



Comparative proteomics and gene expression analysis in *Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance



Lilian S.T. Carmo^{a,1}, Andressa C.Q. Martins^{a,b,1}, Cinthia C.C. Martins^a, Mário A.S. Passos^a, Luciano P. Silva^a, Ana C.G. Araujo^a, Ana C.M. Brasileiro^a, Robert N.G. Miller^b, Patrícia M. Guimarães^a, Angela Mehta^{a,*}

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

1. INTRODUÇÃO

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.), que possui alto teor de óleos e proteínas, é um importante grão nutricional que pode ser consumido *in natura*. *A. hypogaea* é cultivada principalmente na Ásia, África e Américas e representa a quinta cultura de oleaginosa mais produzida em todo o mundo, depois da soja, da colza, da semente de girassol e semente de algodão. A maior parte da produção de amendoim ocorre atualmente em regiões propensas à seca, onde seu crescimento e rendimento podem ser severamente afetados pela escassez de água (Wang et al., 2017; Farooq et al., 2016; Banavath et al., 2018). A necessidade de desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca para melhorar a produtividade e resiliência das culturas sob disponibilidade limitada de água é, atualmente, um grande desafio na agricultura global. Para isso, é fundamental uma maior compreensão dos mecanismos que controlam as respostas do estresse abiótico, incluindo as redes fisiológicas, bioquímicas e reguladoras de genes (Wu et al., 2017; Janiak et al., 2016; Valliyodan e Nguyen, 2006).

Para resistir à deficiência hídrica, as plantas desenvolveram mecanismos complexos para se adaptarem e sobreviverem sob estresse à seca, o que envolve respostas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Farooq et al., 2009). Como os processos celulares também são regulados por modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e atividades enzimáticas, a análise da expressão gênica deve ser complementada por abordagens adicionais (Kottapalli et al., 2009). Por essa razão, estudos proteômicos e metabolômicos estão sendo cada vez mais empregados, separadamente ou em combinação, para melhor entender os mecanismos de resposta e tolerância ao estresse (Chmielewska et al., 2016; Yu et al., 2017). Em amendoim, investigações anteriores sobre os perfis de proteoma de genótipos tolerantes e sensíveis sob estresse hídrico focaram principalmente nos tecidos foliares (Kottapalli et al., 2009; Akkasaeng et al., 2015; Katam et al., 2016). As raízes, no entanto, são os principais locais de percepção do déficit hídrico do solo, desencadeando uma variedade de mecanismos de defesa contra essa condição de estresse (Ghatak et al., 2016). As respostas são tipicamente rápidas, para minimizar os efeitos prejudiciais da redução da disponibilidade de água (Ghatak et al., 2016; Ghosh e Xu, 2014).

Ao contrário do amendoim cultivado, que tem uma base genética estreita e é sensível a condições prolongadas de seca, os parentes silvestres são geneticamente diferentes e apresentam maior tolerância à seca (Leal-Bertioli et al., 2012; Nautiyal et al., 2008; Knauft e Gorbet et al., 1989). Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, mostramos que espécies cultivadas e silvestres exibem padrões de transpiração contrastantes em resposta a condições limitadas pela água (Leal-Bertioli et al., 2012;

Brasileiro et al., 2015; Vinson et al., 2018). *A. duranensis* exibiu um comportamento de transpiração mais conservador para o uso de água (Leal-Bertioli et al., 2012) e foi usada como fonte de alelos para descoberta de genes relacionados à tolerância à seca.

Considerando que os mecanismos moleculares da tolerância à seca são complexos, e que a modulação da expressão gênica pode levar a uma modificação na abundância de proteínas envolvidas na resposta a esse estresse, é importante analisar as mudanças moleculares em diferentes níveis “ômicos”. Nesse capítulo, a abundância de proteínas em raízes de plantas de *A. duranensis* submetidas a déficits graduais de água no solo foi analisada usando uma abordagem 2-DE, e comparada com dados de transcritos da mesma espécie submetidas a estresse hídrico (secagem de raízes ao ar) (Vinson et al., 2018). Os dados proteômicos foram comparados com dados transcritômicos obtidos anteriormente (RNA-Seq) (Vinson et al., 2018) e validados por RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa). Os genes candidatos identificados para proteínas de abundância diferencial têm o potencial para serem utilizados no melhoramento genético do amendoim cultivado para tolerância à seca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Crescimento e tratamento das plantas de *Arachis duranensis*

Sementes de *A. duranensis* (acesso K7988) foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa (Embrapa - CENARGEN). O experimento de tolerância à seca foi realizado a partir da diminuição gradual de água no solo (*dry-down*), em casa de vegetação como descrito anteriormente (Leal-Bertioli et al., 2012; Brasileiro et al., 2015). Para tal, foram utilizadas plantas de um mês de idade crescidas em copos plásticos de 500 mL contendo solo estéril (uma planta por copo). As plantas foram divididas em dois grupos: um controle irrigado e um grupo estressado, com cada grupo compreendendo três plantas por repetição biológica. Um total de três repetições biológicas foi analisado. O experimento do tipo *dry-down* consistiu na interrupção da irrigação das plantas do grupo estressado após o solo atingir 70% de capacidade de campo (CC). A taxa de transpiração (TR – *Transpiration Ratio*) de cada planta foi estimada gravimetricamente e normalizada (NTR – *Normalized Transpiration Ratio*), individualmente, com base na razão entre o valor de TR e o valor médio da TR das plantas controle para cada tempo analisado, conforme descrito por Muchow e Sinclair (1991). Raízes de *A. duranensis* dos grupos controle e estressado foram coletadas no quarto dia, com valor de NTR de aproximadamente 0,2, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C.

2.2. Avaliação do teor de clorofila, extravasamento de eletrólitos e teor relativo de água

O teor de clorofila foliar foi estimado em plantas submetidas ao estresse hídrico, uma vez que é um dos principais índices que refletem a responsividade às condições de seca (Sheshshayee et al., 2006). O teor de clorofila foi avaliado com base nas medidas de leituras de clorofila realizadas pelo SPAD (SCRM) (SPAD-502, Minolta Sensing), como descrito por Leal-Bertioli e colaboradores (2012). Durante o experimento do tipo *dry-down* duas medidas de leituras de clorofila foram registradas diariamente a partir do mesmo folíolo da segunda folha totalmente expandida da haste principal de cada planta controle e estressada. Ao final do experimento, quando as plantas atingiram um valor de NTR de aproximadamente 0,2, os folíolos utilizados nas medidas de leitura de clorofila foram coletados e a concentração de pigmentos fotossintéticos determinada de acordo com Yang e colaboradores (2016).

Três discos foliares (0,4 cm²) de cada planta (controle e estressado) também foram coletados e analisados quanto ao extravasamento de eletrólitos (EE) e teor relativo de água (TRA), segundo Brito e colaboradores (2011).

2.3. Extração de proteína e análise 2-DE

Proteínas totais foram extraídas de amostras de raízes de plantas estressadas e controle coletadas no final do experimento de *dry-down* (quarto dia). Cada amostra foi composta por três plantas, agrupadas para formar uma repetição biológica. As proteínas foram extraídas de um total de três replicatas biológicas utilizando fenol, seguido de precipitação com acetato de amônio em metanol, como descrito por Carmo e colaboradores (2013). As proteínas totais foram ressuspendidas em tampão de solubilização (uréia 7 M, tiouréia 1 M, CHAPS 4% m/v, IPG tampão pH 4–7 NL 2% e DTT 40 mM) e quantificadas utilizando o reagente de Bradford (BioRad). Aproximadamente 600 µg de proteínas foram carregadas em Immobiline™ DryStrips de 13 cm, pH 4-7 (GE Healthcare), em seguida, submetidas a focalização isoelétrica utilizando um Sistema de Focagem Isoelétrica Ettan™ IPGphor™ 3 (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. As tiras de gel foram equilibradas durante 15 minutos em tampão de equilíbrio (tris-HCl 1,5 M pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2% e azul de bromofenol 1%) contendo DTT 1 M, depois durante 15 minutos adicionais no mesmo tampão de equilíbrio com iodoacetamida a 2,5%. A segunda dimensão foi realizada utilizando géis de poliacrilamida a 12%, com inclusão do marcador de massa molecular Benchmark Protein Ladder (Invitrogen), como descrito anteriormente (Carmo et al., 2013). As proteínas foram

coradas com uma solução de Coomassie Blue G-250 (sulfato de amônio 10% [m/v], Coomassie G-250 0,1% [m/v], metanol 20% [v/v] e ácido fosfórico 2%).

2.4. Análise das imagens dos géis e identificação de proteínas

Três géis, um por repetição biológica, foram digitalizados com um ImageScannerIII (GE Healthcare) e as imagens analisadas usando o programa *ImageMaster 2D Platinum*, versão 7.05 (GE Healthcare). Os *spots* foram detectados automaticamente e melhorados pela edição manual para eliminar os artefatos técnicos. Os *spots* foram considerados diferencialmente abundantes com base na ANOVA ($p \leq 0,05$) após análise das imagens. Os *spots* proteicos diferenciais foram excisados dos géis e digeridos com tripsina (Sigma-Aldrich®), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos tripticos foram aplicados em uma placa-alvo MALDI e analisados num espectrômetro de massa Auto-Flex Velocidade MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics), operado nos modos refletor positivo (MS) e LIFT™ (MS/MS). As proteínas foram identificadas usando o mecanismo de busca *MASCOT Matrix Science* com o banco de dados NCBIprot e a taxonomia Viridiplantae. Para análise por impressão digital em massa de peptídeos (PMF – *Peptide Mass Fingerprinting*), a carbamidometilação da cisteína foi considerada como uma modificação fixa e a oxidação da metionina como uma modificação variável. Uma tolerância de 150 ppm e perda de um local de clivagem foram permitidas nas análises. Os mesmos parâmetros foram empregados para análise MS/MS, com a adição de uma tolerância de massa de fragmentos de íons de 0,6 Da e estado de carga de +1. Apenas identificações significativas (p -valor $\leq 0,05$) foram aceitas.

2.5. Análise por RT-qPCR

Ao final do experimento do tipo *dry-down*, as mesmas amostras coletadas para extração de proteínas (raízes estressadas e controle) foram utilizadas para extração de RNA total. O cDNA foi sintetizado de acordo com o protocolo descrito por Morgante e colaboradores (2011) e as sequências nucleotídicas das proteínas identificadas pelo MASCOT determinadas usando o algoritmo tBLASTn e o banco de dados de CDS (sequência de DNA codificadora) de *A. duranensis*, disponível no site *PeanutBase* (<https://peanutbase.org/>) e no *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para cada gene candidato, *primers* específicos foram desenhados usando o software *Primer3Plus*, seguindo os parâmetros descritos por Morgante e colaboradores (2011) (Tabela 1). As reações de RT-qPCR foram realizadas no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems) usando um kit Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG com ROX (Invitrogen, EUA). Três repetições biológicas independentes foram analisadas, com

três réplicas técnicas incluídas para cada reação. Valores do ciclo de quantificação (Cq) e a eficiência dos *primers* foram estimados usando o algoritmo *Miner PCR* em tempo real (Zhao e Fernald, 2005). Os valores médios de Cq foram normalizados contra dois genes referência, ou seja, *ACT1* e *60S*, conforme previamente estabelecido (Morgante et al. 2011). A análise estatística da taxa de expressão dos transcritos de mRNA no grupo estressado em comparação ao grupo controle foi realizada utilizando o programa de expressão relativa *REST* 2009, versão 2.0.13 (Pfaffl et al., 2002).

Tabela 1 - Primers desenhados para os genes que codificam as proteínas identificadas.

<i>Spot</i> proteico	Gene	<i>Primer Forward</i> (5'-3')	<i>Primer Reverso</i> (5'-3')	<i>Amplicon</i> (bp)	Eficiência do primer
033	<i>EaseIII</i>	TTTCGGTTACACCTCGATCC	AGAGTGGTTTTGGGCCTCTT	187	0,89
041	<i>NDPK-1</i>	TCAGGTCTGTGTGTGCAT	AGCTATTTCCCGCTTTCCAT	170	0,87
047	<i>DOT-1</i>	CAGGATATGAAGCCGAAAA	GAAGAACAGTGACAGACGCG	167	0,82
052	<i>MLP-43</i>	TTGGTTCTGTCAAGCACTGG	ACAATTCCACCACCACTTCC	190	0,88
087	<i>POZ</i>	GAAGTACGTGGCCTCGGATA	TCCCCTCTGATCCAAAAGG	179	0,88
088	<i>CHI-2</i>	GGGCCTTAGTTTCTCCCAAG	GTTGCAAAACGGCAGGTAAT	164	0,85
101	<i>APX</i>	TGGTCACACTCTGGAGCTG	TCAACAAGAGGGCGGAATAC	183	0,86
104	<i>MSLα</i>	AACCTAGCAACCTCGCAAGA	ACAAGGCTCTCCCAACTG	160	0,82
105	<i>ManGlcBI</i>	TCTTGCAAGGTGATGCAAAAG	CGACTTGATGACGAAGCTGA	185	0,85
122	<i>PSMA6</i>	AGTTGCCATGGTTTTGGGTA	CCGGATTCTTTTTGGACA	173	0,81
147	<i>ANX</i>	ATCTTGGGTCATCGAAATGC	CCATCTTTTGGTTGCTTCGT	189	0,84
158	<i>GS56</i>	TGAAATGGCCTCTAGTTGG	CCCCTGTCCAGGCATAACT	180	0,86
178	<i>SAM</i>	TCCCAGAGCCACTCTCTGTT	ACGTCCGAAATGTCCGTAAG	185	0,85
184	<i>ENO</i>	CATTGGAATGGATGTTGCTG	GTGCTCCCAATCATCTTGGT	193	0,84
196	<i>ATPase</i>	GGACGTATCCCATCTGCTGT	TGGTAGCAGGAGCAGGATCT	157	0,83
220/360	<i>HSP70^a</i>	TGTGCCTGCTTACTTCAACG	CTCAAGCACCGAGACATCAA	193	0,85
224	<i>HypP</i>	AAGGCCGTGTACATCCTTTG	CAGCCTGTGCAATTTCTTCA	183	0,86
246	<i>MDH</i>	CCCCGCTTGTCTGATTTA	GCGGGGATAACAACAACATC	160	0,86
252	<i>MatK</i>	GCGTCTTTTTGAGCGAATC	CGCATTCTTTGAAGCCAGA	155	0,88
257/266	<i>MLP-34^a</i>	CAGCGTTGGTGGTTCTGTTA	ACAGTGGCACCTCCATTCTC	198	0,83
258	<i>HSP17,3</i>	TTCTGCGTTTCGTCACACTC	CCAGGTGTCGTTCTTGTCTC	175	0,87
270	<i>SHMT4</i>	GGCGGGTATGATCTTCTTCA	CCCAGGTGACATAGCCTGTT	181	0,86
291	<i>Cht2</i>	GCCCATGGCTTCTACACCTA	CCCATTCAAATTCATCTGG	173	0,84
327	<i>TFIIF^b</i>	AATTCAGGAAGGCAAACCTG	GAAAGTCTTACCATCCATCG	151	-
332	<i>SRPBCC</i>	GTGAGGACTGGCAAAGCATC	TGCATGGTGAGCTTCAAGAC	178	0,89
335	<i>APRT</i>	TGCAGGTGTTGAAGCAAGAG	TAAGGCTCGATCTCCACGTT	190	0,87
348	<i>Leo-1</i>	TCAGAAATCCTGATGGCACA	CCTTCCCATGTCTGAGGAAA	159	0,88
361	<i>MetE</i>	TCCACCTCCTGCTCACTTCT	AGAAGGCCTCGTTCTTGTGA	157	0,87
392	<i>TMED</i>	ACCTTTGCCTGATTACAC	TTGTGGAAGGGTTAGCATCC	165	0,89

^a Isoformas com o mesmo *gene model* identificado no *PeanutBase*.

^b *Primers* que não produziram um produto de amplificação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil de transpiração, conteúdo de clorofila, extravasamento de eletrólitos e teor relativo de água após *dry-down*

Neste estudo, plantas da espécie silvestre *A. duranensis* foram analisadas quanto ao seu perfil de transpiração (representado pelo comportamento da NTR) durante quatro dias, aos quais foram submetidas a uma diminuição gradual da disponibilidade de água no solo (Figura 8A). O perfil de transpiração obtido por medidas gravimétricas nesse experimento, revelou um padrão de resposta da NTR à secagem do solo compatível com dados previamente observados para *A. duranensis* e outras espécies silvestres de *Arachis* (Leal-Bertioli et al., 2012; Brasileiro et al., 2015). Enquanto as plantas controle irrigadas mantiveram um valor médio de NTR 1,0 ao longo do tratamento, as plantas estressadas apresentaram uma diminuição gradual, alcançando valores de aproximadamente 0,2 ao quarto dia de experimento (Figura 8A). Além disso, o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides), estimado por SCMR, aumentou nas plantas estressadas quando comparadas as plantas controle, o que pode indicar uma possível resposta adaptativa de *A. duranensis* para preservar a eficiência fotossintética (Figura 8B-D). Um aumento no teor de clorofila em plantas sob déficit hídrico já foi observado anteriormente, predominantemente em genótipos descritos como tolerantes à seca (Zaefyzadeh et al., 2009; Larkunthod et al., 2018).

Outros dois importantes indicadores de estresse hídrico analisados foram o teor relativo de água na folha (TRA) e o extravasamento de eletrólitos (EE). Com relação ao TRA, uma redução significativa de 42,7% foi observada entre plantas estressadas e controle (Figura 8E). Uma diminuição no TRA é uma resposta precoce ao déficit hídrico e representa variações no ajuste osmótico, como observado anteriormente em genótipos de amendoim tolerantes e sensíveis à seca (Katam et al., 2016). Por outro lado, o aumento da deficiência hídrica leva, em geral, a maior permeabilidade da membrana plasmática, o que resulta em maior EE (Katam et al., 2016). De fato, um aumento significativo de 21,8% nos valores de EE foi observado entre as plantas estressadas e controle (Figura 8F). Quando comparado com plantas controle, o fenótipo visual das plantas estressadas de *A. duranensis* também foi compatível com sintomas típicos de deficiência hídrica (murcha) (Figura 8G), e em concordância com nossos estudos anteriores (Brasileiro et al., 2015).

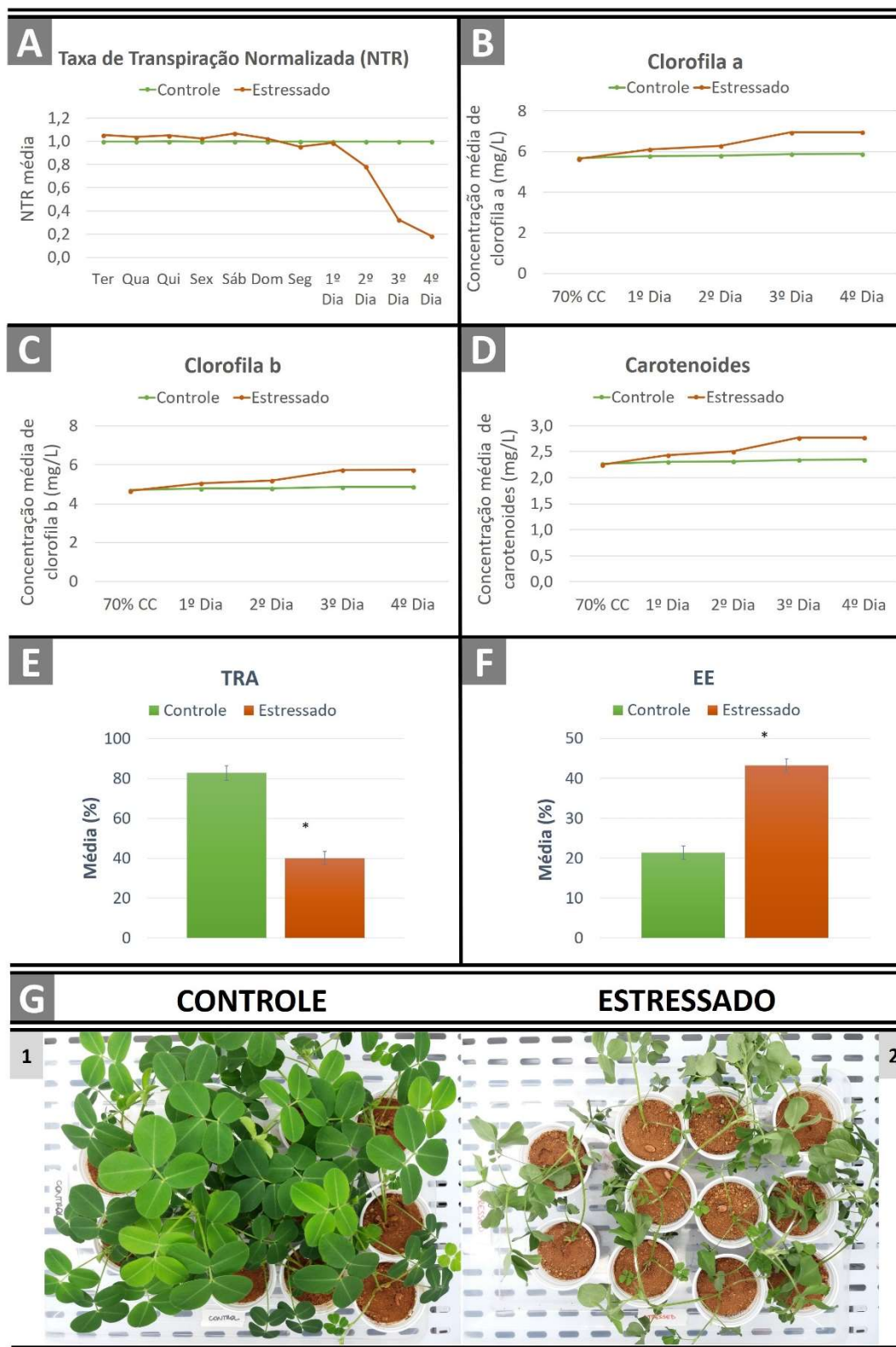


Figura 8 – Plantas de *A. duranensis* submetidas a uma diminuição gradual da água (*dry-down*). A) Taxa de transpiração normalizada (NTR) de plantas de *A. duranensis* durante o experimento de *dry-down*. **B-D)** Concentração média dos pigmentos fotossintéticos em plantas controle e estressadas (clorofila a, clorofila b e carotenoides) durante o experimento. **E-F)** Teor relativo de água (TRA) e extravasamento de eletrólitos (EE) em folhas de *A. duranensis* ao final do experimento (quarto dia). **G)** 1: fenótipo normal da parte aérea de plantas controle de *A. duranensis*. 2: Sintomas nas partes aéreas de plantas *A. duranensis* estressadas, mostrando murcha e evidente dessecação das folhas.

3.2. Proteínas responsivas à seca em raízes de *A. duranensis*

A análise 2-DE do perfil do proteoma de raiz de *A. duranensis* revelou aproximadamente 400 *spots* proteicos (Figura 9; Figura Suplementar 1). Por meio da comparação de plantas sob estresse hídrico e controle, um total de 59 proteínas significativamente abundantes ($p \leq 0,05$) foram detectadas na condição de estresse, incluindo 15 com aumento e 19 com abundância diminuída. Três proteínas foram identificadas como exclusivas em plantas estressadas e 22 exclusivas na condição de controle. Todos os 59 *spots* proteicos diferencialmente abundantes foram analisados por espectrometria de massa, dos quais 31 foram identificados com sucesso usando o software MASCOT (Figura 10; Tabela 2). Estes compreendiam dez com aumento e 13 com abundância diminuída, sete exclusivos de plantas controle e um exclusivo da condição estressada. Essas proteínas foram classificadas em diferentes grupos com base em suas funções previstas usando a ferramenta de anotação de sequência Mercator (Lohse et al., 2014).

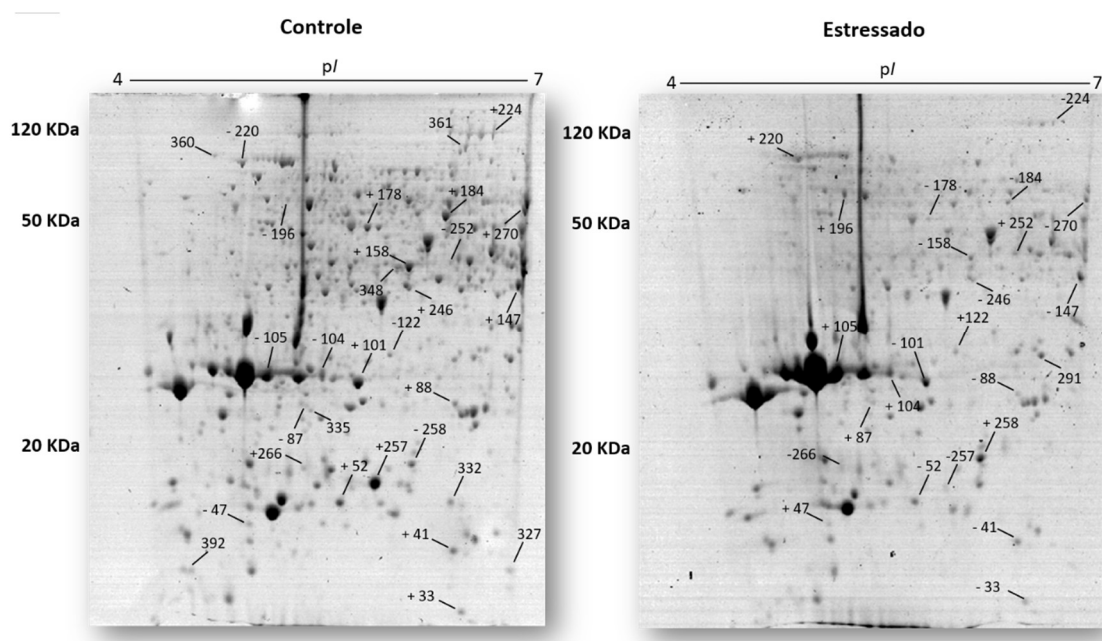
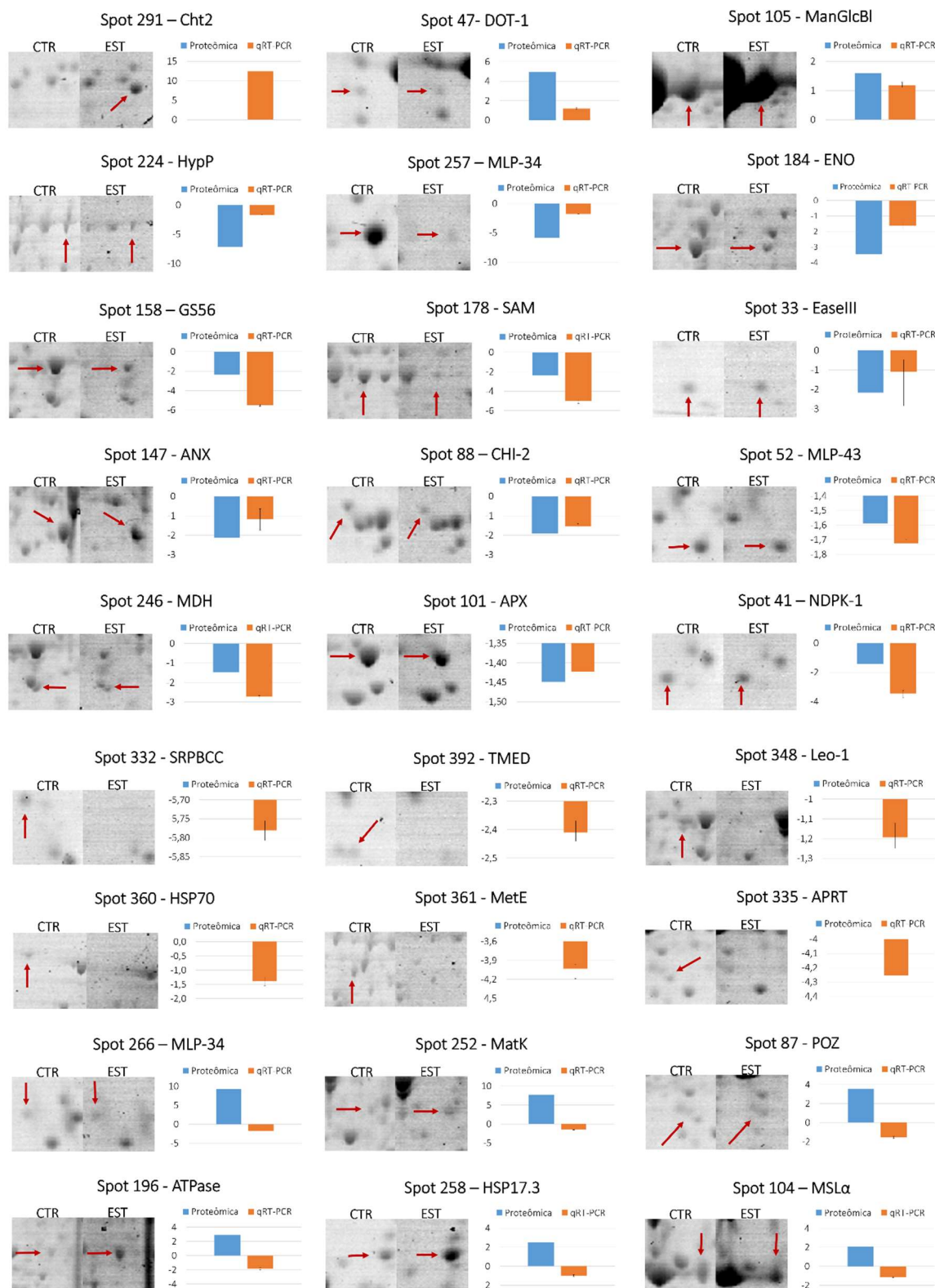


Figura 9 - Mapas comparativos em 2D de raízes de *A. duranensis* sob condições controle e de estresse hídrico mostrando proteínas diferencialmente abundantes. (+) abundância aumentada, (-) abundância diminuída e () proteína exclusivas em ambas as condições.

3.3. Proteínas relacionadas a estresse

A categoria funcional de estresse conteve o maior número de proteínas, com 25% do total de proteínas identificadas (Figura Suplementar 2). Entre essas proteínas, duas foram exclusivas para o controle: proteína desconhecida (SRPBCC – *spot* 332) e uma proteína estromal relacionada ao choque térmico de 70 kDa (HSP70 – *spot* 360). Cinco

outras proteínas aumentaram em abundância em resposta à seca: proteína tipo MLP 34 (MLP-34 – spots 257 e 266) proteína tipo MLP 43 (MLP-43 – spot 52), proteína tipo choque térmico da classe I de 17,3kDa (HSP17.3 – spot 258) e HSP70 (spot 220).



(continua na próxima página)

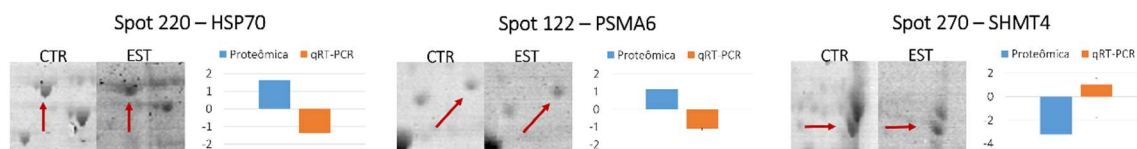


Figura 10 - Perfil da abundância de 30 proteínas identificadas pela técnica de 2-DE em raízes de plantas de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico (EST) e na condição controle (CTR). Os gráficos representam a variação da abundância diferencial de proteínas (barra azul – determinada pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05) e a expressão diferencial dos genes putativos que codificam essas proteínas (barra laranja – determinada por RT-qPCR). Gráficos sem barras azuis representam proteínas exclusivas das raízes controle (SRPBCC, TMED, Leo-1, HSP70 [spot 360], MetE e APRT) ou plantas estressadas (Cht2).

Apesar de o grupo de enzimas quitinase da classe II ser comumente identificado em fungos, bactérias e plantas, uma quitinase-2 (Cht-2 – spot 291) foi identificada exclusivamente nas raízes estressadas (Figura 9; Tabela 2). Nas plantas, essas quitinases estão associadas a respostas de defesa a patógenos e tolerância a estresses ambientais. De fato, vários estudos mostraram um aumento nos transcritos e proteínas de quitinase sob condições de seca (Grover, 2012; Ye et al., 2015; Li et al., 2018). Em *A. hypogaea*, foi relatado que uma quitinase (classe II) como única em folhas de uma cultivar tolerante à seca e ausente em cultivares suscetíveis durante o tratamento de déficit hídrico (Katam et al., 2016). A superexpressão de genes codificadores de quitinase em plantas transgênicas também foi relatada como conferindo tolerância à seca (Kwon et al., 2007; Sarjaz e Chalavi, 2011).

Três outras proteínas relacionadas ao estresse pertencentes à família MLP também foram identificadas: uma MLP-43 (spot 52) e duas proteínas MLP-34 (spot 257 e 266) (Figura 9; Tabela 2). As MLPs pertencem à família Bet v 1 com função biológica desconhecida, mas demonstraram ser induzidas em resposta a patógenos e estímulos ambientais e durante o desenvolvimento de frutas/flores (Osmark et al., 1998; Ruperti et al., 2002; Yang et al., 2015; Wang et al., 2016). Aqui, a MLP-43 de *A. duranensis* mostrou uma abundância diminuída (-1,59 vezes) em resposta à seca. Curiosamente, as duas isoformas da proteína MLP-34 revelaram uma forte modulação em resposta à condição de seca, mas com padrões de abundância opostos: uma apresentou um aumento (9,29 vezes – spot 257), enquanto a outra uma diminuição (-5,82 vezes – spot 266) (Figura 9; Tabela 2). Esse comportamento contrastante pode ser devido à presença de *splicing* alternativo em uma das isoformas dessas proteínas, como observado em *A. thaliana* (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SSK7>), de acordo com o banco de dados curado UniProt. Tem sido demonstrado que as isoformas de proteínas podem ter funções biológicas distintas, bem como padrões de expressão diferentes (Stastna et al., 2012). Também é possível que modificações pós-traducionais possam explicar as diferenças em massa e pI/ponto isoelétrico).

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massas em raízes de *A. duranensis* controle e estressadas pela seca.

Spot proteico	Descrição e abreviação da proteína	Sequência peptídica ^a	Organismo	Acesso ^b	Massa (kDa) teor.	Massa (kDa) exp.	pI teor.	pI exp.	Índice Mascot	Cobertura (%)N° de peptídeos combinados (MS)	Fold Change ^c
<i>Metabolismo de aminoácido</i>											
178*	S-adenosylmethionine synthase (SAM)	- K.TIFHLNPSGR.F R.FVIGGPHGDAGLTGR.K K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGLTK-K	<i>Actinidia chinensis</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Petunia x hybrida</i>	P50303 AFN54653 AFN54653 P48498	39 43 43	50	6.20 5.16 5.16	5.79 67 114	126 2/1 3/1	30/10 2/1 3/1	-2.39
361	Cobalamine-independent methionine synthase (MetE)	K.YGAGIGPGVYDIHSR.I	<i>Solenostemon</i> <i>Scutellarioides</i>	CAA89019	87	89	6.17	6.49	52	2/1	Exclusivo do Controle
<i>Metabolismo-C1</i>											
270	Serine hydroxymethyltransferase 4 (SHMT4)	- K.LLICGGSAYPR.D K.NAVFGDSSALAPGGVR.I K.ISATSIYFESLPYK-V K.VNSQTYIDYDRLEEK.A R.YYGGNEYIDEIENLCR.A	<i>Arachis hypogaea</i>	AGL08226 AGL08215 AGL08215 AGL08215 AGL08215 AGL08215	52 52 52 52 52 52	55	6.65 6.84 6.84 6.84 6.84 6.84	6.92 61 78 53 51 61	187 2/1 3/1 2/1 3/1 3/1	41/22 2/1 3/1 2/1 3/1 3/1	-3.20
<i>Organização celular</i>											
147	Annexin Annexin Annexin Annexin Fiber annexin, partial Fiber annexin, partial (ANX)	- K.LLLPLVSSYR.Y K.ADPKDEFLALLR.S K.ALDKELSNDFER.L R.WTSSNQVLMEIACR.S K.SLEEDVAHHTTGEFRK.L R.IPQPVPVADDCQLRK.A	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Lavatera thuringiaca</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Arachis hypogaea</i>	AKE98365 AKE98365 AAB71830 AKE98365 ACF74290 ACF74290 AKE98365	36 36 36 36 18 18 36	37	7.10 7.10 6.06 7.10 5.97 5.97 7.10	6.88 38 72 69 88 84 199	199 3/1 3/1 3/1 9/1 10/1 48/16	48/16 3/1 3/1 3/1 9/1 10/1 48/16	-2.12
<i>Síntese de DNA</i>											
33	Predicted protein (Endonuclease III homolog 2, chloroplastic-like isoform X4) (EaseIII)	-	<i>Nicotiana glauca</i>	XP_009799827	32	12	9.60	6.48	78	19/6	-2.19
<i>Glicólise</i>											
184	Predicted protein (Enolase) Enolase Enolase Enolase Enolase (ENO)	- K.VNQIGSVTESIEAVR.M R.AAVPSGASTGIYEALRLR.D R.IEEEELGDAAVYAGANFR.A R.GNPTVEVDLTCSDGTFAR.A	<i>Glycine max</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Ricinus communis</i> <i>Triticum Urartu</i> <i>Glycine max</i>	XP_003521438 P42896 P42896 EMS66544 NP_001237329	53	53	5.49 5.56 5.56 5.21 5.31	6.35 106 105 127 4/1	116 3/1 4/1 3/1 4/1	35/12 3/1 4/1 3/1 4/1	-3.39
<i>Manuseio de metal</i>											
178*	S-adenosylmethionine synthase (SAM)	- K.TIFHLNPSGR.F R.FVIGGPHGDAGLTGR.K K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGLTK-K	<i>Actinidia chinensis</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Petunia x hybrida</i>	P50303 AFN54653 AFN54653 P48498	39 43 43	50	6.20 5.16 5.16	5.79 67 114	126 2/1 3/1	30/10 2/1 3/1	-2.39
<i>Transporte de elétron mitocondrial/Síntese de ATP</i>											
196	F0F1-type ATP synthase, beta subunit ATP synthase subunit beta ATP synthase subunit beta (ATPase)	- R.FTQANSEVSALLGR.I R.IPSAVGYQPTLATDLGGLQER.I	<i>Medicago truncatula</i> <i>Nicotiana</i> <i>Plumbaginifolia</i> <i>Nicotiana</i> <i>Plumbaginifolia</i>	KEH44140 P17614 P17614	59 59	59	5.80 5.95 5.95	5.19 48 75	117 2/1 3/1	33/14 2/1 3/1	2.89
<i>Sem atribuição</i>											
47	Glycine-rich protein DOT1-like (DOT-1)	K.AVGHAGYEVGR.T	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015942611	14	16	5.21	4.99	82	7/1	4.94

(continua na próxima página)

Tabela 2 (continua)

Spot proteico	Descrição e abreviação da proteína	Sequência peptídica ^a	Organismo	Acesso ^b	Massa (kDa) teor.	Massa (kDa) exp.	pI teor.	pI exp.	Índice Mascot	Cobertura (%) / N° de peptídeos combinados (MS)	Fold Change ^c
327	Misture	-	<i>Phoenix dactylifera</i>	XP_008775984	33	13	6.28	6.76	88	21/6	Exclusivo do Controle
	Predicted protein (transcription initiation factor IIF subunit alpha-like)		<i>Glycine max</i>	XP_014627905	16		9.95			34/5	
	Predicted protein (Uncharacterized protein) (TFIIF)										
348	Hypothetical protein (Plant-specific B3-DNA binding domain)	-	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002325640	88	40	8.15	5.98	85	9/7	Exclusivo do Controle
	Predicted protein (Leo1-like protein) (Leo-1)	K.NIFGSDSEDDDDGDR.V	<i>Ostreococcus Lucimarinus</i>	XP_001422426	41		4.15		27	4/1	
Metabolismo-N											
158	Glutamine synthetase GS56, partial	-	<i>Arachis hypogaea</i>	ACF74298	17	42	4.99	6.09	80	70/7	-2.37
	Hypothetical protein (Glutamine synthetase, beta-Grasp domain)	K.HKDIIAAYGEGNER.R	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002972155	41		6.04		87	3/1	
	Glutamine synthetase GS56, partial	R.IIAEYIWIGSGMDIR.S	<i>Arachis hypogaea</i>	ACF74298	17		4.99		89	10/1	
	Glutamine synthetase 1a	R.LTGKHETADIHTFSWGVANR.G	<i>Lolium perenne</i>	ACR45959	39		5.40		71	5/1	
Metabolismo de nucleotídeo											
41	Nucleoside diphosphate kinase 1 (NDPK1)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AAZ20283	16	15	6.30	6.41	92	40/6	-1.43
		K.LIGATNPLASEPGTIR.G							68	10/1	
		R.KLIGATNPLASEPGTIR.G							85	11/1	
335	Adenine phosphoribosyl transferase (APRT)	K.AFKDTIDLIVER.Y	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_192981	20	24	5.24	5.38	52	6/1	Exclusivo do Controle
		R.YRDQNSIVVAGVEAR.G	<i>Trifolium repens</i>	ADD09567	20		5.36		48	8/1	
Proteína (degradação e modificação pós-traducional)											
87	Speckle-type POZ protein-like protein (POZ)	-	<i>Aegilops tauschii</i>	EMT12448	39	25	6.56	5.35	88	21/8	3.57
105*	Mannose/glucose-binding lectin precursor (ManGlcBI)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AAA74576	28	27	5.36	5.11	83	26/8	1.59
		R.VLHSTQVR.L		AAA74572	30		5.71		58	2/1	
		R.DHLPEWGR.V		AAA74575	28		5.95		51	3/1	
		R.RDGTQTLNVLVTYDANSK.N		AAA74576	28		5.36		65	6/1	
		-LDLSFSYNNFEQDDER.N		AAA74576	28		5.36		140	6/1	
		-LDLSFSYNNFEQDDERNLILQGGDAK.F		AAA74576	28		5.36		110	10/1	
122	Hypothetical protein (Proteasome_alpha_type_6) (PSMA6)	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007133143	27	29	5.58	5.96	149	47/12	1.15
Redox											
101	Cytosolic ascorbate peroxidase (APX)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	ABM45856	27	26	5.52	5.75	222	70/20	-1.45
		K.GSDHLRDVFGK.A		ABM45856	27		5.52		59	4/1	
		R.LAWHSAGTFDVATK.T		AAZ20282	26		6.00		96	5/1	
		K.ALLSDPVFRPLVEK.Y		AAZ20282	26		6.00		56	5/1	
		K.HPSELAHGANAGLDIAVR.L		AAZ20282	26		6.00		133	7/1	
		K.YAADEDAFFADYAEHLK.L		AAZ20282	26		6.00		156	7/1	
		R.SGFEGPWTNSNPLIFDNSYFK.E		AAZ20282	26		6.00		65	8/1	
RNA (processamento de splicing)											
252	Maturase K, partial (chloroplast) (MatK)	-	<i>Chamaecrista absus</i>	AFU54444	33	42	9.68	6.43	81	21/6	7.67
Metabolismo secundário											
88	Type II chalcone isomerase (CHI-2)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AJF45950	24	25	5.99	6.42	113	4/1	-1.94
		K.FSKDDTIPEHR.N							55	4/1	
		K.TPAQLLDSLHFYR.D							80	26/8	

(continua na próxima página)

Tabela 2 (continua)

Spot proteico	Descrição e abreviação da proteína	Sequência peptídica ^a	Organismo	Acesso ^b	Massa (kDa) teor.	Massa (kDa) exp.	pI teor.	pI exp.	Índice Mascot	Cobertura (%) / N° de peptídeos combinados (MS)	Fold Change ^c
Sinalização											
104	Mannose-specific lectin CML-2 (MSL α)	R.ALYLAQVHLSDK·S K.VIAVEFDTFDTR.S	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015942682	30	27	5.48	5.49	80	4/1	2.07
105*	Mannose/glucose-binding lectin precursor (ManGlcBI)	- R.VLHSTQVRL R.DHLPEWGR.V R.RDGGQLNLVLTVDANSK·N -LDSLFSYNNFEQDDER.N -LDSLFSYNNFEQDDERNLILQGDAK·F	<i>Arachis hypogaea</i>	AAA74576 AAA74572 AAA74575 AAA74576 AAA74576 AAA74576	28 30 28 28 28 28	27	5.36 5.71 5.95 5.36 5.36 5.36	5.11 5.11 5.11 5.11 5.11 5.11	83 58 51 65 140 110	26/8 2/1 3/1 6/1 6/1 10/1	1.59
Estresse abiótico e biótico											
52	MLP-like protein 43 (MLP43)	K.HWDYTIEGK·K K.HWDYTIEGKK.T K.HKENITAASPQSYLDFAIK·V	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015946820	17	16	5.97	5.65	63 57 57	5/1 6/1 12/1	-1.59
257	MLP-like protein 34 (MLP34)	- K.HWTYVIDGK·V K.QLHHVQNVCR.V K.LYDGDVVSQHYK.D K.KLHHVQNVCR.V	<i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis ipaensis</i> <i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis duranensis</i>	XP_015936926 XP_015936833 XP_016170840 XP_015936926 XP_015936833	17 17 17 17 17	17	5.76 5.89 5.89 5.76 5.89	5.88 72 69 88 81	116 72 69 88 81	50/9 5/1 7/1 7/1 7/1	-5.82
258	17.3 kDa class I heat shock protein-like (HSP17.3)	- K.EDKGDWHR.M R.SDFANETTAIANTR.I	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015931443	18	18	6.19	6.13	98 63 113	43/7 5/1 8/1	2.51
266	MLP-like protein 34 (MLP34)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015936926	17	18	5.76	5.11	83	32/5	9.29
291	Chitinase (class II) (Cht2)	R.AFPAFGTTGDDVTR.K K.IGYGSNLDCANQHF.- R.CEAHGFTYNAFVTAAR.A R.GPIQLTSNSNYQLAGQAIK.A	<i>Arachis hypogaea</i>	CAA57774	29	28	6.29	6.65	70 110 95 59	5/1 5/1 6/1 7/1	Exclusivo do estressado
332	Unknown protein (SRPBCC ligand-binding domain superfamily)	K.HWTYVMDGK·V + Oxidation (M) K.FLNMLLRSAANYK.L + Oxidation (M)	<i>Medicago truncatula</i> <i>Theobroma cacao</i>	AFK46559 XP_007032516	18 13	16	5.44 9.33	6.33	52 50	5/1	Exclusivo do Controle
220	Uncharacterized protein (SRPBCC)	-	<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006858478	75	81	5.36	4.86	111	21/12	1.63
360	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (HSP70)	-	<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006858478	75	90	5.36	4.64	167	25/15	Exclusivo do controle
TCA/Transformação org											
224	Hypothetical protein (Aconitase A catalytic domain) (HypP)	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007132546	93	106	6.87	6.69	82	15/11	-7.15
246	Predicted protein (malate dehydrogenase)	-	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002283619	44	38	8.09	6.10	78	17/7	-1.46
	Malate dehydrogenase precursor nodule-Enhanced	K.GVDVVVIPAGVPR.K K.TKPSASFTDEEIEELTVR.I	<i>Medicago sativa</i> <i>Glycine max</i>	AAB99757 AAC24855	43 43		8.11 6.91		46 60	3/1 4/1	
	Predicted protein (malate dehydrogenase)	-									
	Malate dehydrogenase precursor nodule-Enhanced	-									
Transporte											
392	Predicted protein (Transmembrane emp24 domain-containing protein p24delta9-like) (TMED)	-	<i>Elaeis guineensis</i>	XP_010926589	24	13	8.14	4.52	87	19/5	Exclusivo do controle

^aO símbolo "-" indica que nenhuma impressão digital da massa do péptido (PMF) e/ou nenhuma sequência peptídica foram geradas.

^bMais de um acesso citado, indica diferentes acessos para peptídeos identificados a partir da mesma proteína.

^cFold Change é expresso pela relação do spot, comparado entre os volumes dos spots dos estressados e de controle. Proteínas exclusivas para cada tratamento são listadas como tal. O sinal "-" indica proteínas diminuídas.

Proteínas de choque térmico (HSPs – *Heat shock proteins*) também foram associadas à resposta ao estresse. Estas proteínas onipresentes desempenham um papel importante como chaperonas, agindo em diversos processos moleculares protetores que incluem dobramento e degradação de proteínas sob condições de estresse. Essas proteínas podem estar localizadas no citoplasma e organelas, contribuindo para a homeostase celular por meio de inter-relações com outras vias de sinalização ou cooperando com outros componentes para diminuir o dano celular, como relatado em estudos anteriores sobre estresse abiótico, especialmente em resposta ao calor (Park et al., 2015; Haider et al., 2017; Wang et al., 2017). Neste estudo, a abundância de duas proteínas de choque térmico foi aumentada em plantas estressadas: uma proteína de choque térmico da classe I de 17,3kDa (HSP17.3 – *spot* 258; 2,58 vezes) e uma proteína estromal relacionada ao choque térmico de 70kDa (HSP70 – *spot* 220; 1,63 vezes). Outro *spot* identificado como HSP70 (*spot* 360) foi exclusivo do grupo controle (Figura 9; Tabela 2). Essa diferença em abundância pode ser devida à existência de várias isoformas da HSP70, com respostas diferentes ao mesmo estímulo (Junkunz et al., 2011). Outra possibilidade é a ocorrência de modificação pós-traducional, uma vez que ambos os *spots* proteicos de HSP70 apresentaram *pI* e massa diferentes (Tabela 2). Estudos proteômicos anteriores revelaram a modulação de várias proteínas de choque térmico, incluindo as proteínas HSP70 e/ou HSP17.3, em folhas de amendoim (*A. hypogaea* L.) sob estresse pelo frio (Chen et al., 2014) e sob seca (Kottapalli et al., 2009; Katam et al., 2016; Thagella et al., 2018).

3.4. Proteínas relacionadas ao processamento de RNA ou com função hipotética

Além das seis proteínas associadas à resposta ao estresse, duas proteínas adicionais parecem estar envolvidas na resposta de tolerância à seca em plantas silvestres de *Arachis*, pertencentes às categorias funcionais “não atribuído” e “RNA” (Figura Suplementar 2). Estas proteínas, uma nomeadamente proteína tipo DOT1 rica em glicina (DOT-1 – *spot* 47; 4,94 vezes) e uma Maturase K (MatK – *spot* 252; 7,67 vezes), mostraram uma abundância diminuída em plantas estressadas pela seca. Embora o DOT-1 tenha sido detectado sem uma função conhecida (não atribuída, desconhecida) de acordo com a classificação com a ferramenta de anotação de sequências – Mercator, estudos associaram proteínas ricas em glicina com processos biológicos que incluem estrutura da parede celular, defesa vegetal e estresses abióticos, incluindo a seca (Mangeon et al., 2010; Gómez et al., 1988; Chen et al., 2007; Huerta-OCampo et al., 2011; Yao et al., 2016). Por outro lado, a Maturase K está associada ao processamento de RNA (Figura

Suplementar 2; Tabela 2). As maturases estão envolvidas na união dos íntrons do tipo II e, portanto, nos processos de transcrição e pós-transcrição (Schmitz-Linneweber et al., 2015). Essas proteínas são encontradas em bactérias e genomas organelares de diferentes eucariotos (protistas, fungos, plantas e alguns animais), e incluem mitocôndrias (MatR) e cloroplasto (MatK) (Schmitz-Linneweber et al., 2015; Zoschke et al., 2010; Malik et al., 2017). Nas plantas, MatK é um fator geral de *splicing* de cloroplasto, atuando no *splicing* de pri-mRNA em mRNA maduro (Schmitz-Linneweber et al., 2015; Zoschke et al., 2010; Malik et al., 2017; Xu et al., 2016). Malik e colaboradores (2017) também relataram MatK de *Bowenia* sp. com uma alta homologia com as proteínas nMAT2 e nMAT4, indicando a possibilidade de certos nMATs realizarem *splicing* tanto nas mitocôndrias quanto nos cloroplastos. Tem sido demonstrado que a MatK é altamente induzida durante o estresse salino em folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.), sob estresse de frio em folhas de lótus (*Saussurea lanieceps*) e em resposta à longo prazo à toxicidade de manganês em raízes de citrus (You et al., 2014). Em contraste, Xiao e colaboradores (2009), ao compararem duas populações de *Populus* (*Populus cathayana*) sob condições de seca, uma de região de clima seco e outra de clima chuvoso/úmido, observaram uma diminuição na abundância de uma proteína MatK na população adaptada ao clima seco. O aumento da abundância das proteínas responsivas à seca, DOT-1 e MatK, em plantas silvestres de *Arachis* sugere que elas podem participar da manutenção da estrutura celular e do processo de adaptação às condições de seca.

3.5. Proteínas exclusivas de raízes de plantas de *A. duranensis* não estressadas

Vale ressaltar que 22 proteínas foram exclusivas em raízes na condição controle (Tabela Suplementar 1), sete das quais foram identificadas: uma mistura de proteínas (fator de iniciação da transcrição IIF tipo subunidade alfa [TFIIF] e proteína não caracterizada – *spot* 327], uma proteína predita (proteína tipo Leo-1 [Leo-1] – *spot* 348); proteína desconhecida (domínio de ligação ao ligante da superfamília SRPBCC [SRPBCC] – *spot* 332), adenina fosforibosiltransferase (APRT – *spot* 335), proteína estromal relacionada ao choque térmico de 70kDa (HSP70 – *spot* 360), metionina sintetase independente de cobalamina (MetE – *spot* 361) e proteína predita (proteína tipo p24delta9 contendo o domínio emp24 transmembranar – *spot* 392) (Tabela 2). De acordo com a anotação de sequência baseada no Mercator, as proteínas foram classificadas em diferentes categorias funcionais relacionadas ao estresse abiótico/biótico, metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, transporte e regulação da transcrição (Tabela 2). Em geral, uma regulação negativa da expressão gênica é relatada na literatura em diversas espécies de plantas em

resposta à seca (Molina et al., 2008; Le et al., 2012; Yin et al., 2015; Poersch-Bortolon et al., 2016). Considerando que *A. duranensis* pode possuir mecanismos que promovem níveis mais altos de tolerância à seca, é possível que essas proteínas estejam presentes de forma constitutiva para perceber e responder rapidamente ao déficit hídrico e, em seguida, são diminuídas em fases posteriores do estresse. Estas proteínas podem ser investigadas por meio da superexpressão do seu transcrito correspondente, sendo o TFIIF um candidato interessante, considerando que os fatores de transcrição são importantes componentes da resposta à seca, responsáveis pela regulação de potenciais genes alvo (Syed et al., 2011; Joshi et al., 2016).

3.6. Análise comparativa do proteoma e da expressão gênica em raízes estressadas

Os níveis de expressão para os genes que codificam as proteínas identificadas foram examinados por RT-qPCR, a fim de verificar a correlação entre os conjuntos de dados. Para isso, os modelos de gene (*gene models*) de *A. duranensis* correspondentes a cada uma das 31 proteínas identificadas foram obtidos no *PeanutBase* (www.peanutbase.org) e *primers* específicos desenhados (Tabela 1; Tabela Suplementar 2). Para as proteínas que mostram duas isoformas, HSP70 (*spots* 220 e 360) e MLP-34 (*spots* 257 e 266), foi encontrado apenas um *gene model* para cada um, Aradu.24A4H e Aradu.D4Z5N, respectivamente (Tabela Suplementar 2), com cada um deles gerando apenas um perfil RT-qPCR. Todos os pares de *primers* testados apresentaram alta eficiência, variando de 0,81 a 0,89 (Tabela 1). A análise da curva de dissociação apoiou a especificidade de amplificação de todos os transcritos como um único fragmento, com exceção do transcrito Aradu.NGG06, correspondente à proteína TFIIF (*spot* 327), que foi excluída da análise. No total, foram obtidos 30 perfis de expressão de RT-qPCR, correspondendo a 28 transcritos distintos.

A análise RT-qPCR revelou que a maioria dos transcritos examinados em raízes estressadas mostrou um padrão de regulação negativa (Figura 10; Tabela Suplementar 2). Apenas quatro genes foram positivamente regulados, codificando uma quitinase-2 (Cht2), uma proteína tipo DOT1 rica em glicina (DOT-1), um precursor de lectina ligante de manose/glicose (ManGlcBI) e uma serina hidroximetiltransferase 4 (SHMT4). Curiosamente, a análise comparativa entre a abundância de proteína e os perfis de expressão RT-qPCR mostrou que a maioria das proteínas e genes (21 de 30) exibiram comportamentos semelhantes (Figura 10), confirmando os dados de abundância observados através do resultado de 2-DE.

Os resultados obtidos pelas análises de 2-DE e RT-qPCR foram comparados com dados de transcrito *in silico* obtidos por nosso grupo a partir de *A. duranensis* (acesso K7988), em que as plantas foram submetidas à desidratação por retirada de solução nutritiva hidropônica (Vinson et al., 2018). Nesse estudo, as raízes foram coletadas em sete momentos durante os estágios iniciais da desidratação e bibliotecas de cDNA foram analisadas por RNA-Seq (BioProject number PRJNA284674). A abundância de proteínas e os valores de expressão gênica obtidos por RT-qPCR foram plotados juntamente com os dados do transcrito *in silico* em um gráfico de calor (*heatmap*) produzido pelo programa R. A maioria dos transcritos que codificam as proteínas identificadas neste estudo (27 de 31) foram encontrados no banco de dados de transcritos de *A. duranensis*. Quando todas as três abordagens foram comparadas (proteômica, *in silico* e RT-qPCR), um comportamento de expressão similar foi obtido para 15 genes (Figura 11), dos quais 14 foram regulados negativamente. Apenas o gene que codifica a quitinase (Cht2; *spot* 291), o produto proteico exclusivo das plantas estressadas na análise proteômica, foi regulado positivamente em todas as análises. Cinco genes apresentaram padrões de expressão contrastantes na comparação entre as análises proteômicas e transcritômicas (RNA-Seq e RT-qPCR), incluindo genes codificadores da proteína tipo MLP-34 (MLP-34; *spot* 266), maturase K (MatK; *spot* 252), ATP sintase subunidade beta (ATPase; *spot* 196), proteína de choque térmico da classe I de 17,3 kDa (HSP17.3; *spot* 258) e proteína hipotética (PSMA6; *spot* 122) (Figura 11; Tabela Suplementar 2).

A análise de clusterização dos dados obtidos a partir de análises proteômicas, transcritômicas, *in silico* e RT-qPCR, possibilitou a classificação de 23 genes e suas proteínas em cinco grupos (1-5), de acordo com similaridades em seus níveis de transcrição e abundância proteica (Figura 11A). No maior cluster (cluster 4), todos os 11 representantes foram regulados negativamente nas três análises, exceto o gene que codifica SAM (*spot* 178), para o qual não foi encontrado o transcrito correspondente. Os demais agrupamentos (2, 3 e 5) revelaram comportamentos de expressão distintos nas análises. O cluster 1 agrupou proteínas e mRNAs com a mesma regulação positiva em resposta ao estresse, embora nenhuma transcrição pudesse ser identificada no conjunto de dados do transcrito (Figura 11A). Os grupos 2 e 3 foram formados por representativos que exibiram um comportamento de expressão contrastante, ou seja, proteínas com abundância aumentada na análise 2-DE, mas com expressão gênica negativa em análises de expressão do transcrito *in silico* e/ou RT-qPCR. O cluster 5 agrupou as proteínas com abundância diminuída e regulação positiva nas análises de transcrito ou RT-qPCR. A análise de clusterização das proteínas exclusivas de um tratamento específico também foi realizada (Figura 11B), identificada no tratamento estressado (Cht2) ou no controle (SRPBCC, HSP70, TFIIF, APRT, TMED, Leo-1 e MetE). Três grupos foram formados para

essas proteínas e seus transcritos de genes correspondentes, com o maior cluster (cluster 3) compreendendo cinco proteínas encontradas como únicas no controle, mas reguladas negativamente em resposta ao déficit hídrico em análises de expressão *in silico* e RT-qPCR (Figura 11B), com exceção do TFIIF, para o qual não foi observada amplificação via RT-qPCR. Curiosamente, o cluster 1 continha apenas um representante, para uma quitinase (Cht2) destacada por ser modulada apenas em raízes de *Arachis* estressadas e mostrando uma regulação positiva correspondente na expressão gênica baseada em análises de expressão do transcriptoma *in silico* e RT-qPCR (Figura 11B).

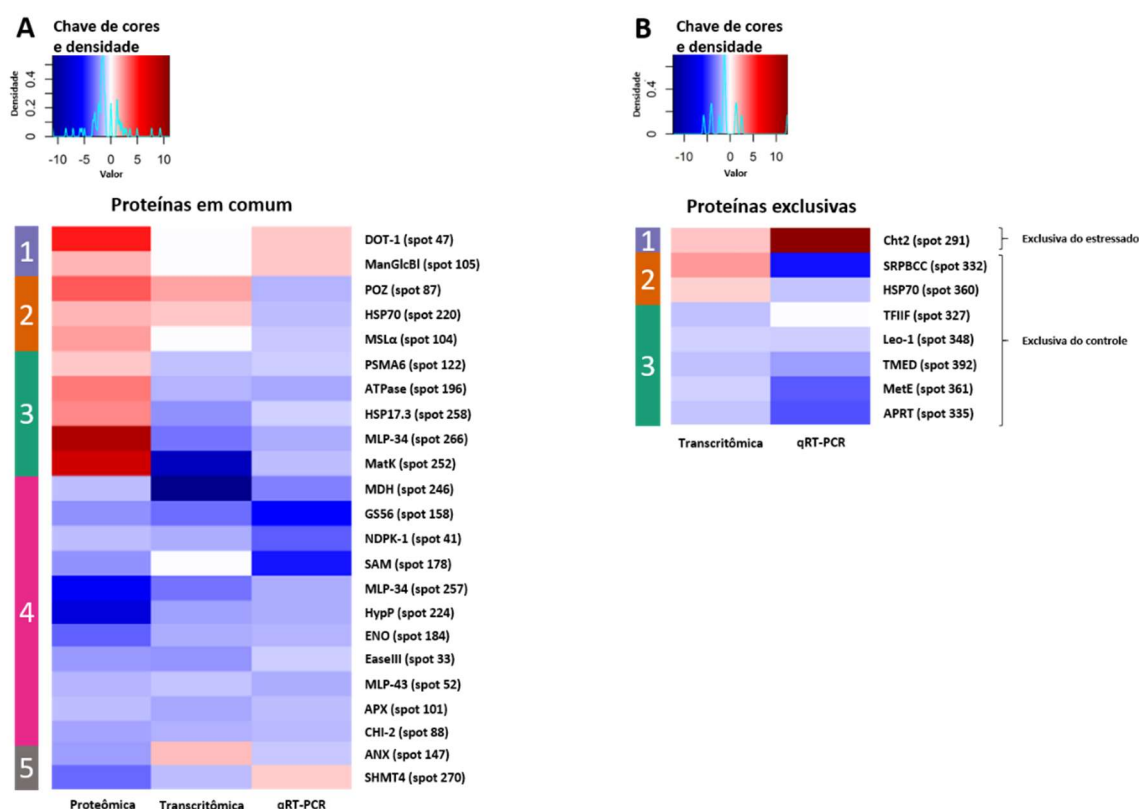


Figura 11 – Mapa de calor de da expressão diferencial do proteoma e transcriptoma (*in silico* e RT-qPCR) em raízes de *A. duranensis* controle e submetidas à seca. A) Análise de clusterização de proteínas com abundância diferencial e seus mRNAs correspondentes (*in silico* e RT-qPCR). B) Análise de clusterização de proteínas exclusivas e seus correspondentes mRNAs (*in silico* e RT-qPCR). Na escala vermelho-azul, as cores vermelhas mais escuras indicam o gene mais regulado e o azul mais escuro dos genes menos regulados.

Embora a resposta das plantas à seca seja um processo altamente dinâmico, os dados obtidos em nosso estudo sobre as respostas à disponibilidade limitada de água em *A. duranensis* em nível transcricional e transducional estavam em grande parte compatíveis. Em plantas, sabe-se que diferentes estratégias podem ser ativadas para controlar a síntese e disponibilidade de mRNA, bem como a atividade proteica em resposta a estímulos ambientais. Nesse trabalho, observou-se que *A. duranensis* parece responder à disponibilidade limitada de água no solo por meio de mecanismos associados com a regulação negativa da expressão de mRNA. Dessa forma, os resultados obtidos, que

incluíram a caracterização abrangente da abundância proteica combinada com os dados de expressão gênica correspondentes, possibilitaram aumentar a compreensão das respostas de tolerância à seca em espécies silvestres de *Arachis*. Além disso, esse trabalho possibilitou identificar proteínas e seus respectivos genes candidatos para análise funcional, com base em abordagens de superexpressão ou silenciamento em plantas modelo e *Arachis*.

4. CONCLUSÃO

Usando abordagens ômicas, mostrou-se pela primeira vez que diferentes proteínas são moduladas durante o déficit hídrico em tecidos radiculares de *A. duranensis*. Diversas proteínas candidatas foram identificadas, em particular aquelas associadas à resposta ao estresse: Cht2, MLP-34, proteínas de choque térmico (HS70 e HS17.3), DOT-1 e MatK. Os perfis transcricionais revelaram que a maioria dos genes apresentou padrões de regulação negativa em raízes estressadas de plantas de *A. duranensis*. Além disso, a análise comparativa entre os perfis proteômicos, expressão gênica via RT-qPCR e transcrito *in silico* mostrou que a maioria das proteínas e transcritos apresentou comportamento semelhante em resposta ao déficit hídrico, sendo a maior parte reprimida nas raízes estressadas. Este é provavelmente um mecanismo regulador preferencial empregado em *A. duranensis* ao perceber o estresse e acionar mecanismos de tolerância à seca.

CAPÍTULO 2

**Proteômica revela genes candidatos para resistência a
Meloidogyne em *Arachis* silvestre**

1. INTRODUÇÃO

Leguminosae é a segunda família de plantas economicamente mais importante, ficando atrás apenas das Poaceae em termos de produção agrícola (Azani et al., 2017). O amendoim, é globalmente a quarta cultura oleaginosa mais importante (USDA/FAS, 2018) e também uma fonte de produtos naturais como flavonoides, isoflavonoides, alcaloides, ácido oleico e linoleico, muitos dos quais possuem propriedades antimicrobianas, farmacêuticas e nutracêuticas (Janila et al., 2016).

Enquanto a espécie cultivada (*Arachis hypogaea* L.) é suscetível a várias pragas importantes, seus parentes silvestres, exclusivos da América do Sul, apresentam altos níveis de resistência contra numerosos fungos foliares, vírus e nematoides, constituindo uma importante fonte de alelos de resistência para exploração em programas de melhoramento de amendoim (Bertioli et al., 2016; Pandey et al., 2012).

Entre os riscos para o cultivo de amendoim, o nematoide das galhas, *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Neal.) Chitwood, é uma grande ameaça à produção na Índia, China e Estados Unidos, onde causa perdas anuais acima de US\$ 1 bilhão (Carpentieri-Pípolo et al., 2014). O controle de doenças é baseado principalmente na aplicação de nematicidas, que são caros, altamente tóxicos e perigosos para o meio ambiente e à saúde humana (Leal-Bertioli et al., 2016). Até o momento, todas as variedades comerciais de amendoim resistentes ao nematoide das galhas abrigam o mesmo segmento de um único cromossomo da espécie silvestre *A. cardenasii* (Nagy et al., 2010; Holbrook e Stalker, 2003), aumentando a necessidade de identificação de novos alelos de resistência para assegurar avanços no melhoramento e prolongar a longevidade das variedades de amendoim resistentes ao nematoide das galhas.

Proite e colaboradores (2008), por meio de observações macroscópicas, verificaram que em raízes de *A. hypogaea* cv. IAC-Tatu-ST inoculadas com *M. arenaria* raça 1, a penetração dos nematoides e o estabelecimento do sítio de alimentação (estágios iniciais da infecção) ocorreram entre o terceiro e o novo dia após a inoculação (DAI). Já em *A. stenosperma* (acesso 10309), além da penetração do nematoide ter ocorrido entre o 8º e 19º DAI e observou-se ainda células hospedeiras necrosadas ao redor da região anterior do nematoide, caracterizando a reação de hipersensibilidade (HR) dessa espécie ao ataque do nematoide.

Esta espécie silvestre foi identificada como potencial doadora para introgressão de alelos para resistência ao nematoide das galhas e outras pragas (Leal-Bertioli et al., 2016; Brasileiro et al., 2014). A análise do transcrito da interação *A. stenosperma*–*M. arenaria* identificou vários genes candidatos presumivelmente envolvidos nessa resposta de defesa, incluindo os genes R (Guimarães et al., 2012; 2015; Morgante et al., 2013). No entanto,

nenhuma pesquisa utilizando uma abordagem proteômica foi realizada para esta espécie, com a maioria dos estudos sobre proteínas no gênero restrito ao cultivado *A. hypogaea* (Guimarães et al., 2017).

As proteínas carregam a função dos genes e estão frequentemente sujeitas a modificações devido a interações proteína-proteína ou em níveis pós-traducionais, consequentemente afetando a resposta de resistência. Além disso, o nematoide das galhas secreta proteínas efetoras que manipulam as vias moleculares e fisiológicas endógenas de seus hospedeiros (Escobar et al., 2011). Estas proteínas causam extensas alterações na expressão gênica da planta em resposta ao patógeno, incluindo a ativação de genes de defesa como peroxidases, quitinases, lipoxigenases, extensina, inibidores de proteinase e genes envolvidos na biossíntese de fitoalexina (Gheysen e Fenoll, 2002; Gheysen e Mitchum, 2009). A compreensão das complexas trocas de sinal que ocorrem durante as interações planta-nematoide e redes gênicas desencadeadas pelas respostas de defesa do hospedeiro é essencial para uma descrição abrangente desse processo de defesa (Jorrín et al., 2006; Prince et al., 2014).

Avanços recentes em proteômica usando métodos de alto rendimento permitiram uma extensa análise de proteínas em plantas, incluindo leguminosas, contribuindo para a atribuição de função a um grande número de genes previamente identificados em projetos de sequenciamento de genoma (Rathi et al., 2016; Lei et al., 2011). Em *Arachis*, a maioria desses estudos concentrou-se em proteínas envolvidas em reações alérgicas, desenvolvimento e tolerância a estresse abiótico nas espécies cultivadas (Viquez et al., 2003; Koppelman et al., 2004; Kang e Gallo, 2007; Kottapalli et al., 2008; Kottapalli et al., 2009; Schmidt et al., 2009; Sun et al., 2013; Zhu et al., 2013; Zhao et al., 2015; Akkasaeng et al., 2015; Katam et al., 2016; Thangella et al., 2018). Poucos estudos foram realizados com espécies silvestres (Kumar e Kirti, 2015; Guimarães et al., 2017). Além disso, a maioria dos estudos do proteoma de *Arachis* spp. foi realizada utilizando-se a metodologia de eletroforese em gel bidimensional (2-DE) acoplada à espectrometria de massa (MS) (Schmidt et al., 2009; Sun et al., 2013; Zhu et al., 2013). Há apenas um único trabalho sobre proteínas de ginóforo em amendoim usando cromatografia líquida livre de gel para separação de proteínas, seguida por espectrometria de massa (LC-MS) (Zhao et al., 2015).

Vários estudos mostram que os dados proteômicos são importantes para apoiar inferências extraídas de estudos transcritômicos (Swarupa et al., 2016; Garcia-Seco et al., 2017; Zhou et al., 2018). Isso é especialmente verdadeiro para culturas menos estudadas, como o amendoim, que apresentam um grande número de genes sem funções atribuídas. Além disso, existem muitas evidências ligando redes de co-expressão de proteínas e

fenótipos emergentes, reforçando a importância de se realizar estudos proteômicos em plantas (Vella et al., 2017; Di Silvestre et al., 2018).

Diante disso, neste capítulo, a busca de proteínas envolvidas na resposta de resistência de plantas de *A. stenosperma* à infecção por nematoide das galhas foi conduzida usando a técnica de 2-DE e 2D-NanoUPLC-MS^E (livre de gel). Esses dados foram comparados aos dados transcritômicos, previamente obtidos por Guimarães et al., 2015, permitindo a identificação de novos candidatos envolvidos nessa resposta de resistência do *Arachis silvestre*. Foi possível a identificação de um novo candidato envolvido nesta resposta de resistência em *Arachis silvestre* e sua validação funcional *in planta*. A análise proteômica combinada aos dados genômicos funcionais existentes contribuirão para um quadro mais completo dos genes e vias envolvidas nos estágios iniciais dessa resposta de defesa, possibilitando identificar alelos envolvidos com a resistência ao nematoide das galhas que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de cultivares de amendoim mais resistentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Crescimento de plantas e tratamento

Plantas de *A. stenosperma* (V10309) com 30 dias de idade foram mantidas em casa de vegetação em copos de 500 mL contendo mistura de areia e solo (2:1) e foram inoculadas com *M. arenaria* raça 1 extraída de plantas de tomateiro de acordo com Hussey e Barker (1973). Para a inoculação, suspensões de nematoide contendo aproximadamente 3000 J2 em água destilada foram pipetadas em quatro cavidades feitas no solo ao redor de cada planta. As plantas controles receberam apenas água destilada e tiveram suas raízes inteiras coletadas (0 DAI - dias após a inoculação), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para extração de proteínas e RNA. As plantas inoculadas foram coletadas aos 3, 6 e 9 DAI, e também armazenadas a -80°C . Os tratamentos foram arranjados inteiramente casualizados, com três réplicas biológicas contendo três plantas cada, para cada um dos quatro pontos de coleta.

2.2. Extração de proteína

Para a extração de proteínas, três repetições biológicas foram produzidas a partir de *pools* de raízes de três plantas para cada grupo: 3, 6 e 9 DAI (inoculado) e 0 DAI (controle). A extração foi realizada usando 450 mg de cada réplica biológica de acordo com De Mot e Vanderleyden (1989), com precipitação durante a noite das amostras em acetato de amônio 0,1 M. Os *pellets* de proteína foram secos à temperatura ambiente durante cinco minutos e suspensos em tampão de solubilização (uréia 7 M; tiouréia 1 M; CHAPS 4% (p/v); tampão IPG 2% (v/v pH 4; DTT 40 mM) ou armazenado em um freezer a -20°C para análise futura. As proteínas foram quantificadas utilizando o concentrado de reagente corante Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante.

2.3. Análise 2-DE (eletroforese bidimensional)

Aproximadamente 800 μg de proteínas, de cada um dos quatro pontos coletados (0, 3, 6 e 9 DAI) foram utilizados para reidratar as *Immobiline™ DryStrip* de 13 cm, pH 4-7 (GE Healthcare Life Sciences™), durante 16 h. A focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi realizada em quatro etapas usando um Ettan™ IPGphor3™ (GE Healthcare Life Sciences™), de acordo com as instruções do fabricante. As tiras de gel foram incubadas durante 15 minutos em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, Uréia 6 M, Glicerol 30%, SDS 2% e azul de bromofenol 1%) contendo DTT 1 M e depois por mais 15

minutos no mesmo tampão contendo 2,5% de iodoacetamina. A separação das proteínas por massa molecular (segunda dimensão) foi realizada utilizando géis de poli-acrilamida a 12% e o marcador de massa molecular Benchmark™ Protein Ladder (Invitrogen™). A eletroforese foi realizada em um sistema vertical com tampão glicina (20 mM Tris HCl pH 8,3, 192 µM glicina e 0,1% (p/v) SDS). As proteínas foram coradas com Coomassie Blue G-250 (sulfato de amônio a 10% (p/v); Coomassie G-250 a 0,1% (p/v); metanol a 20% (v/v) e ácido fosfórico a 2% (v/v)). Três géis, um de cada réplica biológica, foram selecionados e utilizados para análise de imagens com o software ImageMaster 2D Platinum versão 7.05 (GE Healthcare Life Sciences™) conforme descrito anteriormente por Villeth e colaboradores (2015). Proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) entre os grupos inoculado e controle foram identificadas por ANOVA a um nível de significância de 95%, calculado pelo mesmo software utilizado para análise das imagens.

2.4. Identificação de proteínas – 2DE

Os *spots* contendo proteínas diferenciais foram excisados dos géis e os peptídeos analisados em um 4800 Plus MALDI-TOF/TOF na Unidade de Proteômica da Universidade de Córdoba, na Espanha. As proteínas foram identificadas usando o mecanismo de busca MASCOT (Matrix Science) quando aplicado contra o banco de dados NCBIprot e a taxonomia Viridiplantae. Para a análise de Impressão Digital de Massa de Peptídeo (PMF), utilizou-se carbamidometilação de cisteína como fixação e oxidação de metionina como modificação variável, com um intervalo de tolerância de 150 ppm e uma perda de um sítio de clivagem. Para a análise de MS/MS, a mesma parametrização usada na análise de PMF mais emprego de uma tolerância de massa para os fragmentos de íons de 0.6 Da com estado de carga de +1 foi usado. Apenas as identificações com valores de $p \leq 0,05$ foram aceitas.

2.5. Preparação das amostras para análise por 2D-NanoUPLC-MS^E

As proteínas extraídas, em triplicatas biológicas, a partir de amostras controle (0 DAI) e do *pool* de amostras inoculadas (3, 6 e 9 DAI) foram solubilizadas em 60 µL de bicarbonato de amônio 50 mM e preparadas de acordo com Petriz e colaboradores (2015), com modificações. As amostras foram quantificadas usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) e alíquotas contendo 25 µg de proteína total foram transferidas para frascos de recuperação (Waters Corporation), compreendendo 2,5 µL de albumina sérica bovina (3% acetonitrila + 0,1% ácido fórmico para 1 mL BSA) e adição de

quantidade suficiente de 20 mM de amônio para completar um volume final de 100 μ L para cada amostra.

2.6. Análise por 2D-NanoUPLC-MS^E

Para a análise comparativa de peptídeos tripticos entre o grupo controle (0 DAI) e o *pool* inoculado (3, 6 e 9 DAI), foi utilizado o sistema nanoACQUITY™ (Waters Corporation) com tecnologia dupla fase reversa (RP) 2D acoplada ao espectrômetro de massa Synapt® G2 HDMS (Waters Corporation) (MS), com um método livre de marcadores para quantificação de proteínas (Silva et al., 2006, Geromanos et al., 2009, Li et al., 2009). Os peptídeos gerados após digestão com tripsina foram analisados de acordo com Petriz e colaboradores (2015). Triplicatas técnicas foram analisadas para cada uma das três replicatas biológicas produzidas para cada grupo (controle e *pool* inoculado).

2.6.1. Identificação das proteínas a partir dos espectros gerados por 2D-NanoUPLC-MS^E

Os dados obtidos por 2D-NanoUPLC-MS^E foram processados usando o software Protein Lynx Global Server (PLGS), versão 3.0 (Waters Corporation), juntamente com algoritmos específicos (Geromanos et al., 2009, Li et al., 2009). Foram usados os parâmetros descritos por Carmo e colaboradores (2017), que incluem proteínas identificadas com uma taxa máxima de descoberta de falso-positivo (FDR – *False Discovery Ratio*) $\leq 0,04$. Os espectros foram comparados com sequências de aminoácidos traduzidas derivadas a partir do banco de dados de transcritos de *Arachis* spp. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando a intensidade do íon BSA para normalizar as medidas de intensidade observadas da proteína injetada. Somente proteínas presentes em pelo menos duas repetições biológicas e em duas réplicas técnicas foram utilizadas na análise como DAPs.

2.7. Classificação funcional das proteínas e análise da interação proteína-proteína

Todas as proteínas identificadas foram funcionalmente anotadas com ontologia gênica (GO) usando a ferramenta Blast2GO (Conesa et al., 2005), com base nos resultados do BLASTp contra o banco de dados da proteína NCBI nr (*e-value* 10^{-3}). Além disso, atribuições de funções de proteínas foram realizadas usando Mercator/MapMan (Lhose et al., 2014; Thimm et al., 2004). As proteínas foram submetidas à análise de redes

de interação proteína-proteína (PPINs) utilizando a ferramenta STRING v10.5, com todas as sete fontes de interação disponíveis nesta base de dados, bem como um alto índice de confiança (0,700) para geração de redes (Snel et al., 2000; Von Mering et al., 2003; Szklarczyk et al., 2017).

2.8. Análise *in silico* da expressão gênica

As sequências de Illumina (RNA-Seq), previamente geradas por Guimarães e colaboradores (2015) a partir de raízes de *A. stenosperma* inoculadas (3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (0 DAI) com *M. arenaria* raça 1, foram mapeadas no genoma de referência de *A. duranensis* (acesso V14167), espécie filogeneticamente próxima a *A. stenosperma* (Bertioli et al., 2016), disponível no site *PeanutBase* (<https://peanutbase.org>). Foram usadas as configurações padrões do GMAP/Pacote GSNAP (Wu e Nacu, 2010). A expressão diferencial entre as bibliotecas inoculadas e não inoculadas foi determinada por HTSeq-Count (Anders et al., 2013) e pelo pacote estatístico DESeq, baseado em R (Love et al., 2013). Apenas os genes que apresentavam $FDR \leq 0,05$ foram considerados genes diferencialmente expressos (DEGs).

2.9. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de raízes de plantas inoculadas e controle usando o kit de isolamento mirVana miRNA (Invitrogen, Thermo Scientific). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel e quantificada usando um Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA, foram preparados *pools* usando amostras de RNA total de raízes do grupo controle (0 DAI) e amostras de grupos inoculados (3, 6 e 9 DAI). O RNA total foi tratado com DNase (TURBO DNA-free™, Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a 50°C durante 60 minutos em um termociclador Master Cycler (Eppendorf AG, Hamburg) utilizando um kit de síntese de cDNA de primeira geração RNase H Minus da NextGeneration MMLV (DNA Express), de acordo com as instruções do fabricante.

2.10. Desenho dos *primers* e análise por RT-qPCR

A sequência nucleotídica dos transcritos correspondentes às proteínas identificadas por Mascot Sever (software online - Matrix Science) foi obtida por meio da realização de análise tBLASTn contra o CDS (sequência codante do DNA) de *A. duranensis* no PeanutBase.org e contra o transcrito de referência de *A. stenosperma*

(<http://lbi.cenargen.embrapa.br/arachis>). Para cada gene candidato, *primers* foram desenhados usando o software *Primer3Plus* de acordo com Morgante e colaboradores (2011).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicatas técnicas usando o Kit Platinum® SYBR® Green SuperPC-UDG com ROX (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As amplificações foram realizadas em um sistema de PCR em tempo real StepOne™ (Applied Biosystems), usando o método de execução padrão já pré-determinado pelo equipamento. O ciclo ótimo de valores de quantificação (Cq) e eficiência de *primers* foram estimados usando a ferramenta on-line PCR Miner em tempo real (Zhao e Fernald, 2005). Os valores médios de Cq foram normalizados com os genes de referência ACT1 de *A. magna* e 60S de *A. stenosperma* (Morgante et al., 2011). Os cálculos estatísticos da taxa de expressão dos transcritos de mRNA no grupo estressado em relação ao controle foram realizados usando REST 2009 ver. Software 2.0.13 (Pfaffl et al., 2002).

2.11. Análise comparativa da abundância proteica versus expressão gênica

Para comparação dos resultados das análises proteômicas e transcritômicas, os dados de DAPs (valores de abundância proteica a partir do *pool* de amostras inoculadas em relação a amostra controle) e de DEGs (média dos valores de expressão gênica em relação ao controle, dos pontos 3, 6 e 9 DAI), foram plotados em um gráfico de dispersão, por meio do programa R, nos três pontos de infecção (3, 6 e 9 DAI).

3. RESULTADOS

3.1. Análise 2-DE da interação planta-nematoide

Baseado na análise de mapas de proteínas 2D de raízes de *A. stenosperma* controle e inoculadas com *M. arenaria*, realizados com programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Sciences™), detectou-se uma média de 290, 422, 377 e 381 *spots* proteicos entre as triplicatas biológicas em 0, 3, 6 e 9 DAI, respectivamente, com altos níveis de reprodutibilidade entre as amostras (83-97%) (Figura Suplementar 3).

A análise comparativa 2-DE no curso do tempo durante a interação planta-nematoide detectou 23 *spots* proteicos diferencialmente abundantes (DAPs), dos quais 21 foram identificados por MS e/ou MS/MS (Figura 12; Tabela 3).

Apenas oito das 21 DAPs foram mais abundantes em raízes infectadas por nematoides do que em raízes controle: cinamol-CoA redutase 1 (CCR1 - *spot* 48), enolase (ENO - *spot* 205), enzima málica dependente de NADP (NADP-ME - *spot* 234), fator de iniciação da tradução eucariótica (eIF-5A - *spot* 52), UDP-glicosiltransferase 74G1 (UGT - *spot* 319), as duas isoformas da álcool desidrogenase (ADH - *spots* 329 e 354) e proteína hipotética M569_13075 (Hyp_M569 - *spot* 334). As demais DAPs identificadas foram apresentaram abundância diminuída em raízes infectadas em relação as raízes controles (Figura 13).

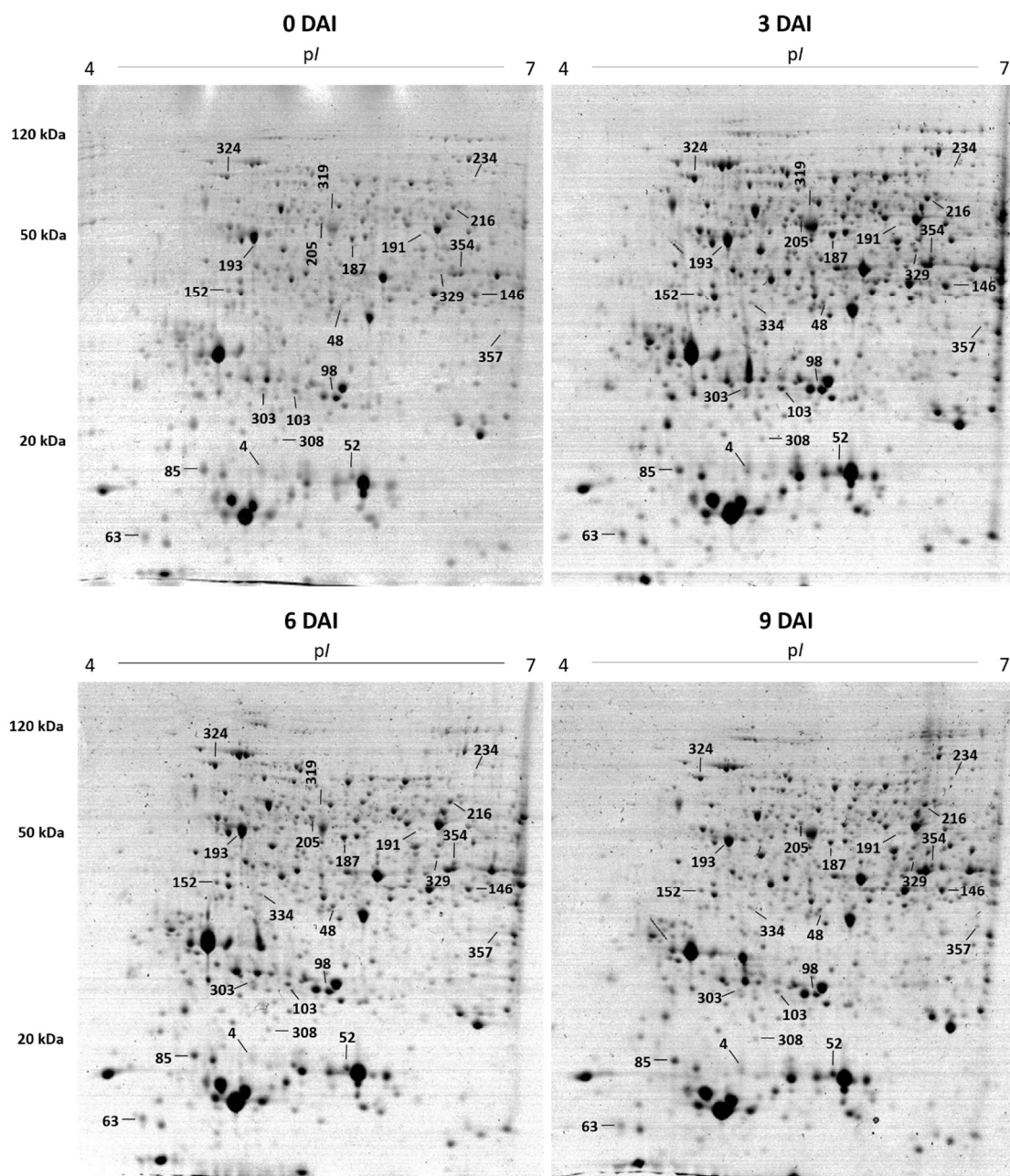


Figura 12 - Mapas comparativos em 2D de raízes de plantas de *A. stenosperma* controle (0 DAI) e inoculadas (3, 6 e 9 DAI) com *M. arenaria*, mostrando proteínas diferencialmente abundantes (DAPs $p \leq 0,05$) estatisticamente avaliadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05.

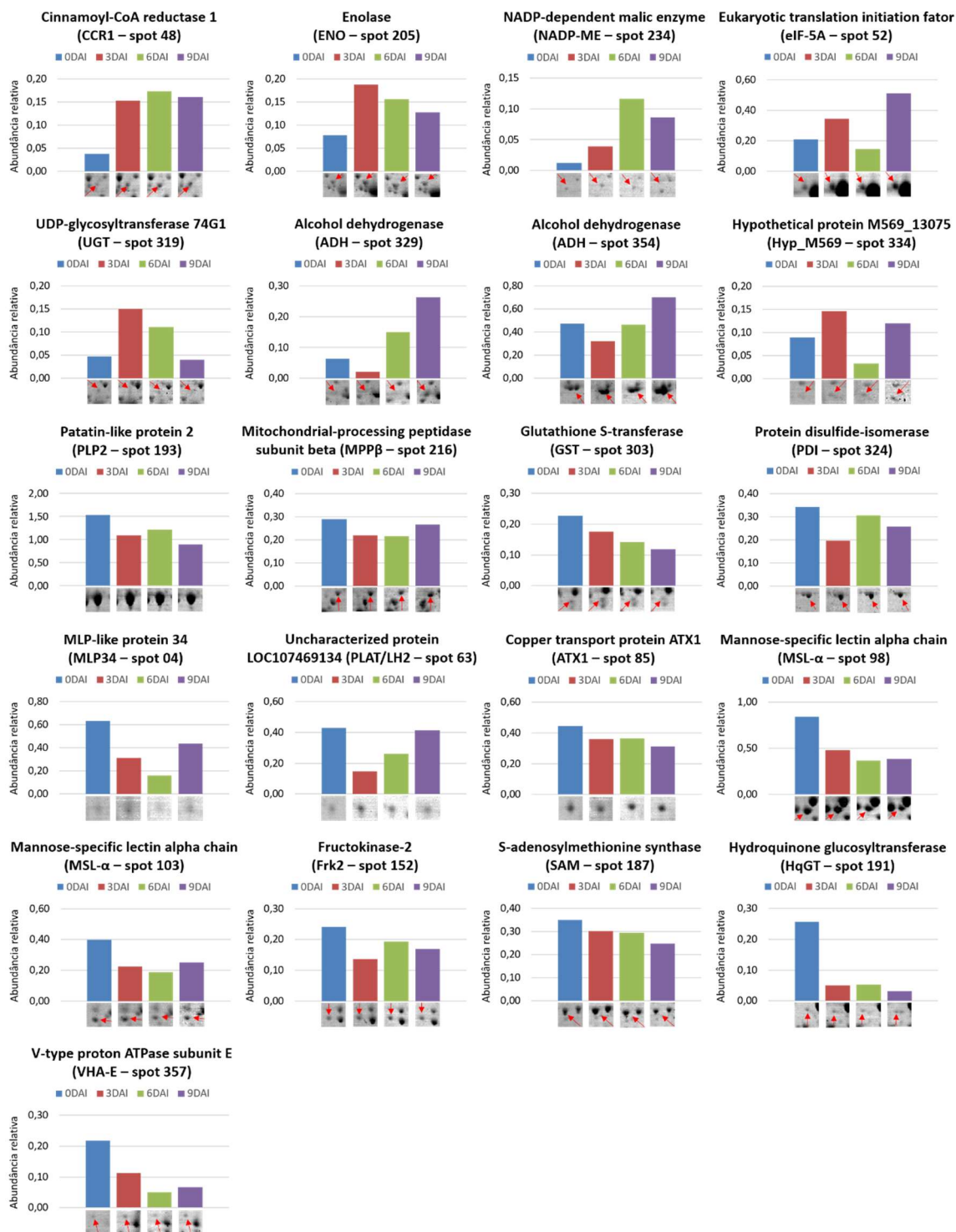


Figura 13 – Perfil de abundância das 21 DAPs identificadas pela técnica de 2-DE em raízes de plantas de *A. stenosperma* inoculadas (3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (0 DAI) com *M. arenaria*. Eixo(Y): representa a abundância relativa (expressa pela % do volume do *spot* determinado pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05), das proteínas identificadas em raízes controles e inoculadas.

Tabela 3 - Proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massas a partir de 2-DE de raízes de *A. stenosperma* controle e inoculadas com *M. arenaria*.

Spot proteico	Descrição e abreviação da proteína	Sequência peptídica ^a	Organismo	Acesso ^b	Massa (kDa) teor.	Massa (kDa) exp.	pI teor.	pI exp.	Índice Mascot	Cobertura (%)N° de peptídeos combinados (MS)	Abundância relativa ^c
<i>Metabolismo de aminoácido</i>											
187	S-adenosylmethionine synthase (SAM)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015945019.1	43	47	5,59	5,86	245	73/28	0,35
		R.FVIGGPHGDAGLTGR.K		XP_015945019.1	43		5,59		325	13/1	0,30
		R.NIGFVSNVDVGLDADNCK.V		XP_015945019.1	43		5,59		325	13/1	0,29
		K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGLTK.R		XP_015945019.1	43		5,59		325	13/1	0,25
<i>Desenvolvimento</i>											
193	Patatin-like protein 2 isoform X1 (PLP2)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_020997563.1	45	47	5,17	5,19	125	46/17	1,54
		K.FLHDTLKEELGSTR.L		XP_020997563.1	45		5,17		461	25/1	1,09
		K.FTTEDIKNFYIDDGAK.I		XP_020997563.1	45		5,17		461	25/1	1,22
		R.LVQSFNSNLVIPTFDVLR.L		XP_020997563.1	45		5,17		461	25/1	0,89
		K.INPVTFQLEPIDDTTTYKQELIR.Y		XP_020997563.1	45		5,17		461	25/1	
		R.IADYFDVIAGTSTGGLITAMLGAPDANANNPR		XP_020997563.1	45		5,17		461	25/1	
		PK.F + Oxidation (M)									
<i>Fermentação</i>											
329	Misture	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015934469.1	41	41	6,09	6,40	102	43/17	0,14
	Alcohol dehydrogenase 1 (ADH)			XP_015967075.1	42		6,64		90	34/15	0,02
	Formate dehydrogenase, mitochondrial isoform X1										0,15
											0,26
354	Alcohol dehydrogenase 1	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015934469.1	41	41	6,09	6,52	166	55/23	0,47
	Unknown (MDR)	K.GKPIYHFVGTSTFSEYTVVHAGCVAK.I	<i>Glycine max</i>	ACU19784.1	31		7,57		112	8/1	0,15
	Alcohol dehydrogenase, partial (ADH)		<i>Arachis hypogaea</i>	AFB69783.1	19		6,36		112	14/1	0,47
											0,70
<i>Glicólise</i>											
205	Enolase 1, chloroplastic isoform X1	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015945832.1	52	53	6,07	5,65	159	47/25	0,08
	Predicted protein (Enolase) (ENO)	K.YGQDACNVGDEGGFAPNVQDNR.E	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgares</i>	BAK00029.1	50		5,65		70	4/1	0,19
											0,16
											0,13
<i>Metabolismo de hormônio</i>											
319	UDP-glycosyltransferase 74G1 (UGT)	-	<i>Arachis ipaënsis</i>	XP_016181542.1	53	54	5,59	5,70	87	28/15	0,07
											0,02
											0,11
											-
<i>Metabolismo de carboidratos maiores</i>											
152	Fructokinase-2 (Frk2)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015935450.1	35	37	5,09	5,02	271	75/30	0,24
											0,14
											0,19
											0,17
<i>Manuseio de metal</i>											
85	Copper transport protein ATX1 (ATX1)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015949536.1	12	18	4,91	4,86	92	65/10	0,45
		K.GNVEPEAVLQTVAK.T			43		5,16		133	26/1	0,36
		K.TAFWENEAPALPTQPENK.L			43		5,16		133	26/1	0,36
											0,31
<i>Não atribuído</i>											
63	Uncharacterized protein LOC9306604 (DUF577)	-	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	XP_002870533.1	74	15	6,02	4,49	87	15/13	0,43
	Uncharacterized protein LOC107469134 (PLAT/LH2)	K.LYDQYGYGIYIK.N	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015944000.1	23		6,05		72	5/1	0,15
											0,26
											0,41
<i>Proteína</i>											
52	Hypothetical protein B456_008G195800	-	<i>Gossypium raimondii</i>	KJB53263.1	11	18	9,25	5,88	92	54/9	0,27
	MLP-like protein 34 (MLP34)	K.LHEGDEWHSVGGSVK.H	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015936926.1	17		5,26		131	18/1	0,34
	Eukaryotic translation initiation factor (eIF-5A)	K.LYDGDVVSQHYKDFK.L			17		5,26		131	18/1	0,14
		K.CHFVGDIFITAK.K	<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	AFC01198.1	17		5,26		87	7/1	0,51

(continua na próxima página)

Tabela 3 (continua)

Spot proteico	Descrição e abreviação da proteína	Sequência peptídica ^a	Organismo	Acesso ^b	Massa (kDa) teor.	Massa (kDa) exp.	pI teor.	pI exp.	Índice Mascot	Cobertura (%)/N° de peptídeos combinados (MS)	Abundância relativa ^c
216	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta, mitochondrial (MPPβ)	- R.FIYDKDIAIAAMGPIQR.L + Oxidation (M) K.TITKDHLDQNYIQTHYTAPR.M K.LLSTDPPTTASQLVAKEPAIFTGSEVR.M	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015932809.1	59	58	6,73	6,48	181	50/29	0,29
					59		6,73		233	111	0,22
					59		6,73		233	11/1	0,22
					59		6,73		233	11/1	0,26
Redox											
324	Protein disulfide-isomerase (PDI)	- K.FSGEYENFIALAEK.L K.LRSDYDFGHTLEAK.H K.FIEDSSIPVVTVFNNDPSNHPFVVK.F	<i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis ipaënsis</i>	XP_015934571.1 XP_016163495.1	57	71	5,00	5,00	331	66/37	0,34
					57		4,98		261	10/1	0,26
										10/1	0,31
										10/1	0,26
RNA											
333	Hypothetical protein M569_13075 (Hyp_M569)	-	<i>Genlisea aurea</i>	EPS61719.1	9	35	9,18	5,32	81	74/8	-
											0,15
											0,03
											0,12
Metabolismo secundário											
48	Cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1)	- K.VAELYPEYNVAK.L K.DIAMAHILAFENK.K + Oxidation (M)	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015948582.1	35	35	5,61	5,78	178	72/25	0,04
									126	8/1	0,15
									126	8/1	0,17
											0,16
191	Hydroquinone glucosyltransferase (HqGT)	-	<i>Arachis ipaënsis</i>	XP_016162634.1	52	49	5,93	6,31	111	38/17	0,26
											0,05
											0,05
											0,03
Sinalização											
98	Mannose-specific lectin alpha chain, partial Mannose-specific lectin alpha chain (MSL-α)	- K.FLGLFNDA SDK.I R.LTNLSDSGNPLGNR.V K.FQGDATITDHN VIR.L R.VLFSDPVHLYDHSGFR.A R.SSAVG YWNWHDGAVTTAK.I	<i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis ipaënsis</i>	XP_020987573.1 XP_016170997.1	21 25	25	5,41 5,29	5,77	129 411	76/13 31/1 31/1 31/1 31/1 31/1	0,84 0,48 0,36 0,38
					21		5,41	5,51	116	76/12	0,42
					25		5,29		394	31/1	0,22
										31/1	0,19
										31/1	0,25
										31/1	
										31/1	
Estresse abiótico e biótico											
04	MLP-like protein 34 (MLP34)	- K.LHEGDEWHSVGGSVK.H K.LYDGDV SQHYKDFK.L	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015936926.1	17	18	5,76	5,28	111	60/10	0,63
									131	18/1	0,31
										18/1	0,08
											0,44
303	Peroxidase 5-like Probable glutathione S-transferase (GST)	- K.SVFTVNEEEREK.N K.GRYESLLASAK.-	<i>Cucumis sativus</i> <i>Arachis ipaënsis</i>	XP_004135971.1 XP_016198440.1	37 25	26	9,40 6,02	5,27	79 188	39/13 15/1 15/1	0,23 0,18 0,14
											0,12
TCA/Transformação org											
234	NADP-dependent malic enzyme isoform X2 (NADP-ME)	-	<i>Arachis ipaënsis</i>	XP_020974349.1	71	70	6,43	6,63	128	40/22	0,01
											0,04
											0,12
											0,09
Transporte											
357	V-type proton ATPase subunit E (VHA-E)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015947693.1	26	32	6,38	6,82	217	76/24	0,22
											0,03
											0,05
											0,07

^aO símbolo "-" indica que nenhuma impressão digital da massa do peptídeo (PMF) e/ou nenhuma sequência peptídica foram geradas.

^bMais de um acesso citado, indica diferentes acessos para peptídeos identificados a partir da mesma proteína.

^cA abundância relativa é expressa pelo volume do spot calculado pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 para as amostras dos pontos 0, 3, 6 e 9 DAI (dias após a inoculação). O sinal (-) indica a não detecção do spot proteico nessa amostra.

As outras 13 DAPs mostraram uma diminuição da abundância durante a interação do nematoide em comparação com a condição controle (Figura 13). Este grupo também incluiu proteínas responsivas ao estresse, tais como proteína tipo MLP-34 (MLP34 - *spot* 04), proteína LOC107469134 contendo o domínio PLAT/LH2 (PLAT/LH2 - *spot* 63), proteína transportadora de cobre ATX1 (ATX1 - *spot* 85), lectina de cadeia alfa específica de manose (MSL α - *spots* 98 e 103), frutoquinase-2 (Frk-2 - *spot* 152), S-adenosilmetionina sintase (SAM - *spot* 187), hidroquinona glicosiltransferase (HqGT - *spot* 191), proteína tipo patatina 2 (PLP2 - *spot* 193), peptidase de processamento mitocondrial de subunidade beta (MPP β - *spot* 216), glutathiona S-transferase (GST - *spot* 303), proteína dissulfeto isomerase (PDI - *spot* 324) e subunidade E da V-ATPase E (VHA-E - *spot* 357).

3.2. Análise 2D-NanoUPLC-MS^E

A análise do proteoma 2D-NanoUPLC-MS^E utilizando um *pool* de raízes de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria* (3, 6 e 9 DAI), permitiu a identificação de aproximadamente 1.400 proteínas, incluindo as 21 DAPs previamente identificadas na análise 2-DE. Foram encontradas 222 DAPs em pelo menos duas das três repetições biológicas, sendo 18 exclusivas para o controle e dez para o grupo inoculado. A grande maioria (81%) das DAPs presentes em ambos os tratamentos (controle e inoculado) foi induzida durante a infecção por nematoides (Tabela Suplementar 3).

3.3. Classificação funcional das proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E

Noventa e cinco por cento das DAPs identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E (212 de 222 DAPs) puderam ser atribuídas a uma categoria GO (*gene ontology*) usando o *Blast2GO*. Todas as 222 DAPs foram ainda classificadas em 28 categorias funcionais hierarquicamente organizadas (BINs) usando a ferramenta de anotação de sequência, Mercator (Figura 14).

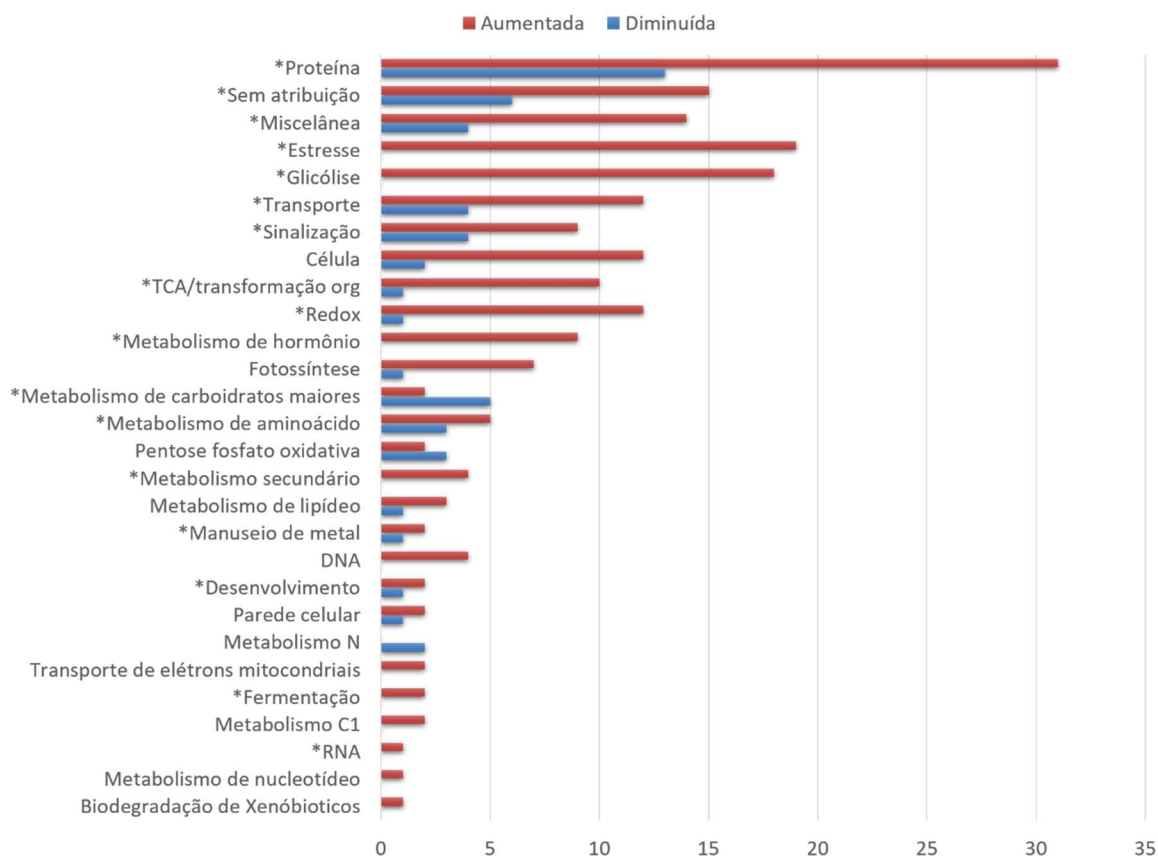


Figura 14 - Visão geral de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E e classificadas em 28 categorias funcionais hierarquicamente organizadas (BINs) pela ferramenta de anotação de sequências - Mercator. (*) Categorias funcionais com DAPs também identificadas na análise 2-DE.

A maior parte de DAPs (16%) foi classificada na BIN 29 (categoria de proteína), com a maioria dos representantes envolvidos na síntese de proteínas (84%), sugerindo um aumento no metabolismo nas raízes de plantas após a infecção por nematoides.

As categorias estresse (BIN 20 - 7%), glicólise (BIN 04 - 6%) e redox (BIN 21 - 5%) foram os grupos mais enriquecidos, englobando proteínas conhecidamente envolvidas na resposta de defesa da planta contra patógenos, como a proteínas relacionadas à patogênese (PRs), quitinase (Cht), peroxidases (PODs), proteínas de choque térmico (HSPs), bem como representantes de álcool desidrogenase (ADHs), fosfoglicerato quinases (PGKs), piruvato quinase (PK), monodesidroascorbato redutase (MDHAR), proteína dissulfeto isomerase (PDIs) e catalase (CAT).

3.4. Rede de interação proteína-proteína

Redes de interação proteína-proteína (PPINs – *protein-protein interactions networks*) entre as 222 DAPs foram analisadas por STRING, seguido por agrupamento usando o método *K-means*. A maioria dessas proteínas (69%) mostrou interação direta ou

indireta (509 interações previstas de 288 esperadas), sugerindo um enriquecimento em suas PPINs após o ataque do nematoide, o que confirma a complexidade dessa resposta de defesa.

No geral, seis clusters distintos com interações diretas foram identificados envolvendo 177 proteínas associadas à resposta de defesa. Estas proteínas pertencem a diversas categorias funcionais, incluindo estresse, glicólise, redox e ciclo de ácido tricarbóxico (TCA), como demonstrado na figura 15. A complexa e intrincada rede de proteínas que é estabelecida durante essa interação planta-nematoide destaca a ativação de vias metabólicas necessárias para manter e proteger a estrutura e a funcionalidade das células durante o ataque de nematoides, a fim de garantir a sobrevivência das plantas.

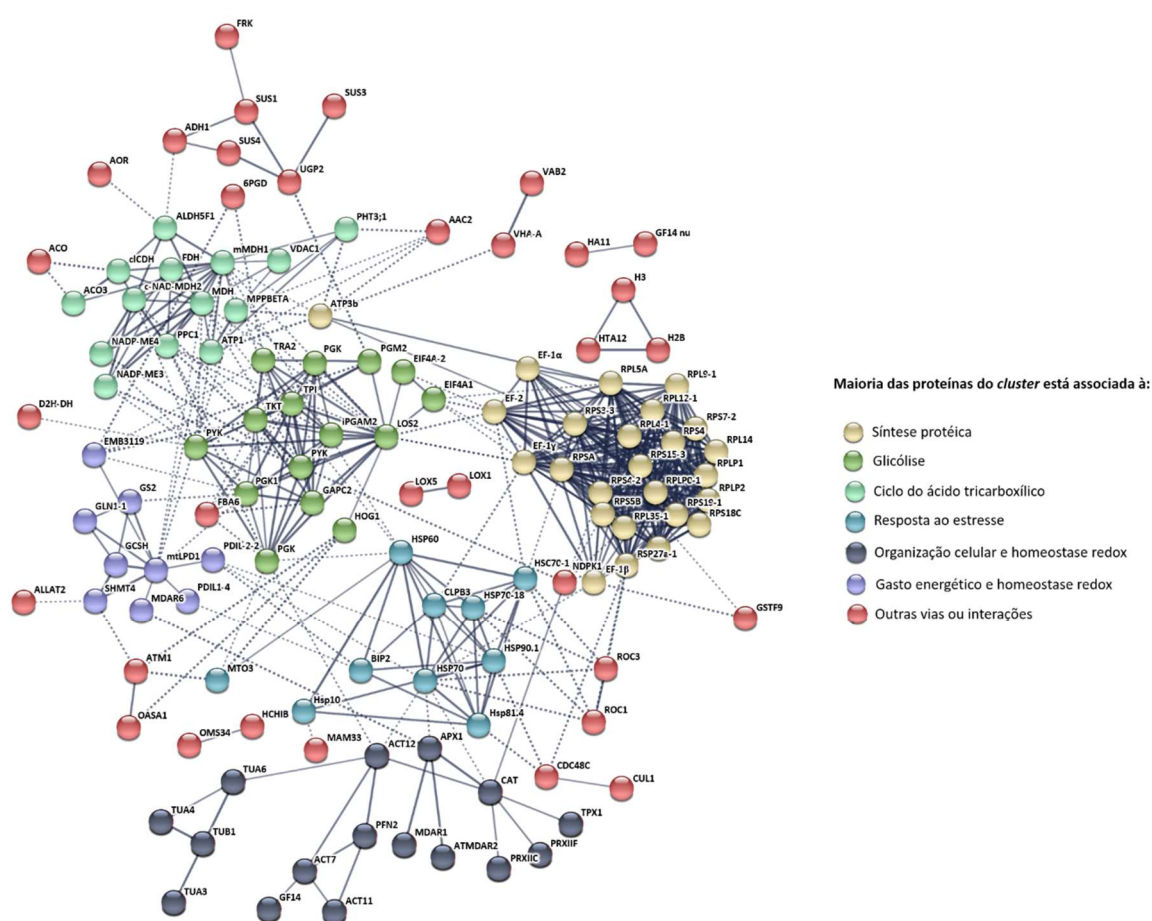


Figura 15 - Redes de interações proteína-proteína identificadas a partir de raízes de *A. stenosperma* inoculadas e não inoculadas com *M. arenaria*.

3.5. Análise do transcrito e proteoma

Transcritos de raízes de *A. stenosperma* infectados com *M. arenaria* previamente obtidos usando Illumina HiSeq (Guimarães et al., 2015) foram mapeados no genoma de *A. duranensis* (<https://peanutbase.org/>). Devido à alta similaridade entre os dois genomas de

Arachis, uma média de 95% das *reads* (de *A. stenosperma* foram mapeadas nos 36.734 genes de *A. duranensis*, com aproximadamente 25.000 genes presentes em cada biblioteca inoculada (3, 6 e 9 DAI). Desse total, genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR $\leq 0,05$) entre amostras inoculadas e controle, foram identificados em 3 DAI (2.485), 6 DAI (4.468) e 9 DAI (2.015) (Figura 16), com cerca de 60% destes genes positivamente regulados durante a infecção pelo nematoide das galhas.

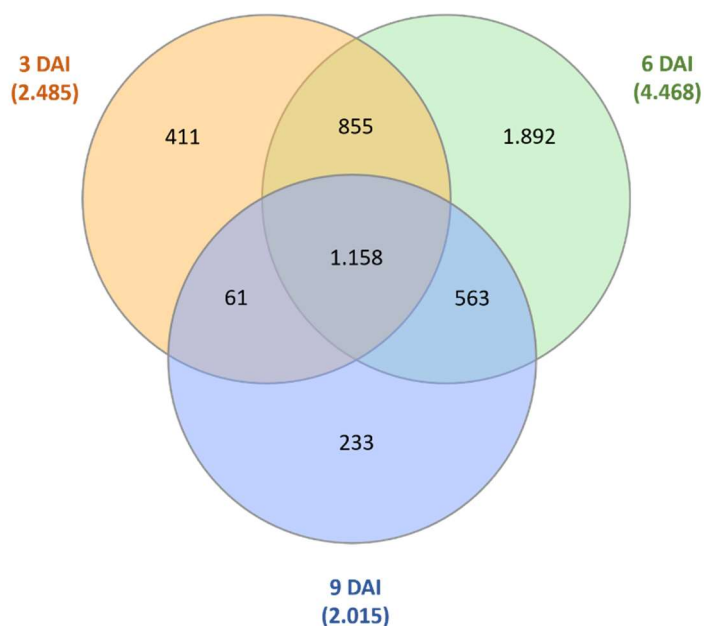


Figura 16 – Diagrama de Venn com a distribuição dos genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR $\leq 0,05$) em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (3, 6 e 9 DAI) em relação as raízes não inoculadas (0 DAI) com *M. arenaria*. DAI – dias após a inoculação. Diagrama gerado conforme Heberle et al., 2015.

Como um todo, as mudanças de expressão nos níveis transcritômicos (DEGs) e proteômicos (DAPs) foram altamente dinâmicas. Dos 5.173 DEGs identificados entre as três bibliotecas inoculadas (3, 6 e 9 DAI), 350 foram identificados em nível proteômico pela análise 2D-NanoUPLC-MS^E, dos quais 85 deles eram DAPs. Cerca de 70% dessas 85 DAPs apresentaram tendências de expressão similares (54 induzidas e 5 reprimidas) entre mRNA e proteína (Figura 17).

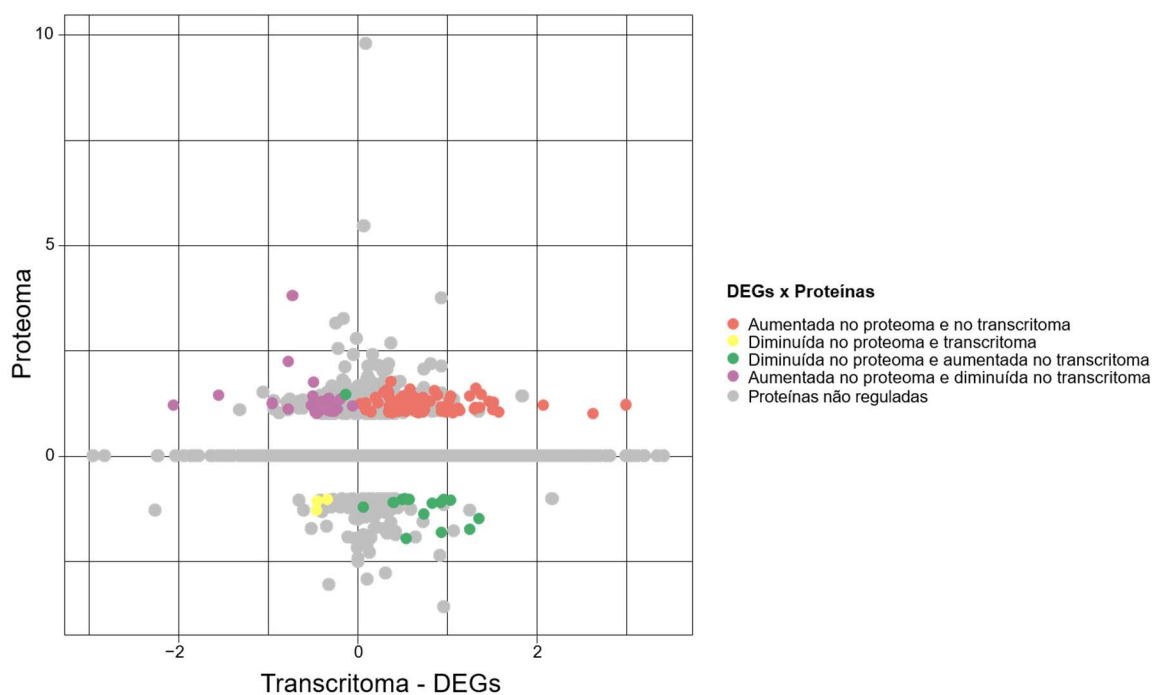


Figura 17 – Sobreposição de proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E e de genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR ≤ 0,05) por RNA-Seq.

Dessa forma, os níveis de expressão para os genes que codificam 18 das 21 DAPs identificadas nas duas análises proteômicas (2DE e 2D-NanoUPLC-MS^E) foram investigados por RT-qPCR, para verificação da correlação dos níveis transcricionais e traducionais. Para tanto, *gene models* de *A. duranensis* correspondentes a cada uma dessas 18 proteínas selecionadas foram obtidos por meio do *PeanutBase* (www.peanutbase.org) e *primers* específicos foram desenhados (Tabela 4). Das 21 DAPs identificadas, duas apresentavam duas isoformas, MSL- α (*spots* 98 e 103) e ADH (*spots* 329 e 354) (Figura 13; Tabela 3), as quais foram associadas a apenas um *gene model* cada. Para esse caso, apenas um perfil de expressão para cada gene um desses genes foi gerado. Além disso, devido a baixa similaridade com as sequências de disponíveis de *Arachis* spp., não foi possível desenhar *primer* para o gene correspondente a proteína Hyp_M569 (Tabela 4).

Todos os 18 pares de *primers* testados apresentaram alta eficiência, variando de 0,75 a 0,93 (Tabela 4), e especificidade de amplificação de todos os transcritos como um único fragmento. No total, 18 perfis de expressão foram obtidos por RT-qPCR, o que revelou que maioria dos transcritos investigados em raízes inoculadas apresentaram um perfil de expressão positiva (Figura 18). Quatro genes foram, transcricionalmente, negativamente regulados (MSL-a, HqGT, PLP2 e UGT).

A partir da análise comparativa entre abundância proteica e níveis de expressão gênica (mRNA) obtidos por RT-qPCR, observou-se que 12 das 18 proteínas analisadas, apresentaram tendências de expressão semelhantes (nove aumentada e três diminuída)

(Figura 18). Por outro lado, o perfil transcricional de seis genes codificadores das DAPs: Frk2, SAM, NADP-ME, GST, VHA-E e UGT, não coincidiu com a abundância de sua respectiva proteína (Figura 18).

Tabela 4 - Primers desenhados para os genes que codificam as proteínas identificadas como diferencialmente abundante.

<i>Gene model</i>	Gene	<i>Primer Forward (5'-3')</i>	<i>Primer Reverso (5'-3')</i>	<i>Amplicon (bp)</i>	Eficiência do primer
Aradu.D4Z5N	<i>MLP34</i>	CAGCGTTGGTGGTTCTGTTA	ACAGTGGCACCTCCATTCTC	187	0,81
Aradu.L1U18	<i>CCR1</i>	AGTGGTGGCAACATCATCAA	AAAATCCCACCCTGCTTTCT	163	0,83
Aradu.ZBM8X	<i>eIF-5A</i>	GAGGAGCACCATTTGAGTC	ACTTAGCGTGACCGTGCTTT	163	0,83
Aradu.MAS03	<i>PLAT/LH2</i>	CACGGCTGGTACTGCAACTA	CTGACACGGGCCTTACTGAT	167	0,81
Aradu.V6UC8	<i>ATX1</i>	ACAGCCTTCTGGGAGAATGA	AAGCCTTGTTCAGGCTCA	151	0,86
Aradu.K9J4G	<i>MSL-α</i>	TTTATTCTCCGACCCTGTGC	CCCAGAAGATTCAGGTGGAA	178	0,90
Aradu.2KV4N	<i>Frk2</i>	CGATTCCTTTGTGCGTTCTC	GGCCAACACATCTTCATCCT	169	0,84
Aradu.X6LF1	<i>SAM</i>	TGCTGACAACGCAAGGTTT	TTGCAAGAACATGGCTCAAG	179	0,91
Aradu.N64BE	<i>HqGT</i>	GCTTGACCCACCTAGTTCCA	TGATTGGAGGGAGAAGGATG	171	0,87
Aradu.5Z359	<i>PLP2</i>	GGGACGTTGCCACAGTAAAT	TAATTGCGCTCAGCATTACG	172	0,75
Aradu.07WQA	<i>ENO</i>	CCGCATGGGTAGTGAAGTTT	CCGCATGGGTAGTGAAGTTT	166	0,85
Aradu.U2UP6	<i>MPPβ</i>	GGAGAATCCCATTTGCTGAA	TTCTGCGTCTGAACCAGTTG	159	0,93
Aradu.S56JH	<i>NADP-ME</i>	GGAGTTCGTCCTTCAGCTTG	TTGCTTCACTGCACACATGA	159	0,86
Aradu.2TG90	<i>GST</i>	GGCTGAGGAAGATGTGAAGC	ATGGGCCTCTCATTGTGAAC	192	0,84
Aradu.X3F5M	<i>UGT</i>	ACGCCAAACTCTGTCAAACC	GCACATGGCTGAGTGAAGAA	165	0,83
Aradu.9645F	<i>PDI</i>	CACGGGGAGAATCATCAGTT	ACAAAAGGATGGTTGCTTGG	172	0,84
Aradu.R2PKH	<i>ADH</i>	ATGAAGCTGGAGGGATTGTG	CCCCTGTCAGTGTGATCCT	163	0,82
-	<i>Hyp_M569^a</i>	-	-	-	-
Aradu.6T7JH	<i>VHA-E</i>	GTTGACCGCGAGGTGTATCT	CAAGCAGCAACTGTCCAAA	197	0,87

^a Não foi possível desenhar *primer* para esta proteína devido à sua baixa identidade com as sequências de *Arachis* disponíveis nas bases de dados (NCBI, PeanutBase.org e *Arachis Transcriptome Survey*).

Por outro lado, o perfil transcricional dos outros três genes codificadores de DAPs: SAM (*spot 187*), GST (*spot 303*) e UGT (*spot 319*), não coincidiu com a abundância de sua respectiva proteína (Figura 10).

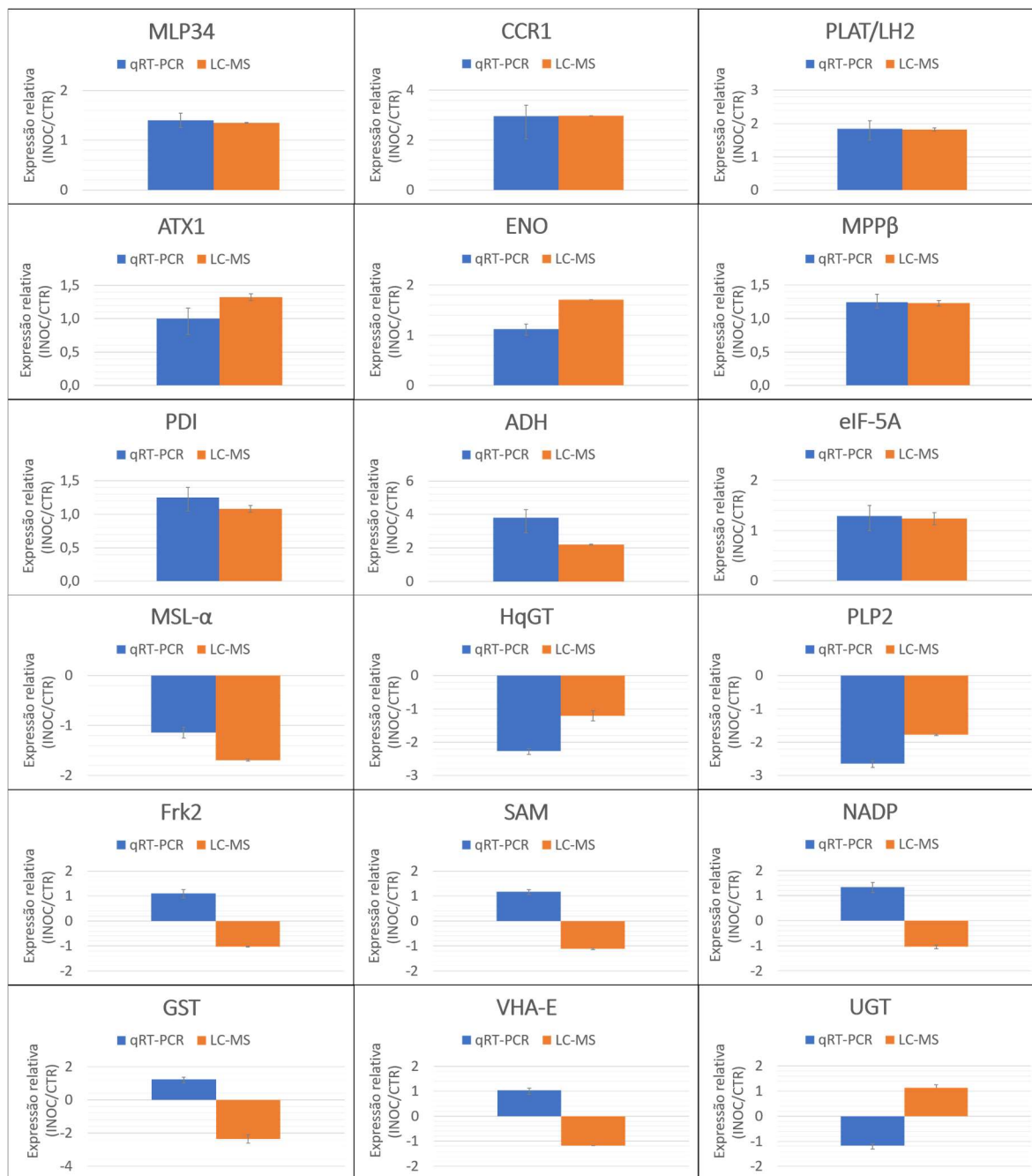


Figura 18 - Visão geral da expressão gênica e abundância proteica de 18 DAPs identificadas em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (INOC - 3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (CTR - 0 DAI) com *M. arenaria*. Os gráficos representam a variação da expressão diferencial dos genes putativos que codificam estas proteínas (mRNA - barras azuis) e a abundância diferencial de proteínas (barra vermelha - determinada por análise 2D-NanoUPLC-MS^E - Proteína Lynx Global Server - PLGS) (INOC/ CTR). As barras de erro referem-se às diferenças encontradas entre as replicatas técnicas testadas.

4. DISCUSSÃO

As relações planta-nematoide envolvem interações complexas, que incluem a sobrevivência do nematoide e estratégias de defesa das plantas (Curtis, 2007). Embora a compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem o parasitismo dos nematoides das galhas e a defesa da planta permaneça incompleta, sabe-se que tanto a imunidade

desencadeada por patógeno (PTI) quanto a imunidade desencadeada pelo efector estão envolvidas nessa resposta de defesa (Peng e Kaloshian, 2014; Teixeira et al., 2016; Kaloshian et al., 2011).

Além das aplicações de nematicida, o controle dos nematoides das galhas nas culturas foi baseado, principalmente, na implantação de genes de resistência (genes R) como o *Mi* em tomate, *N* e *Me* em pimenta, *Ma* em cerejeiras e *Mae* e *Mag* em amendoim que conferem forte resistência aos nematoides (Jacquet et al., 2005; Thies e Fery, 2000; Lecouls et al., 1997; Garcia et al., 1996).

Esses genes de resistência são então responsáveis por desencadear respostas de ETI a jusante, tipicamente envolvendo ROS, sinalização fitormônica e síntese de proteínas relacionadas a patogênese (PR) que, resultando, em muitos casos, a morte celular, típico de reação de hipersensibilidade (HR). No entanto, a eficácia dessa estratégia tem sido ameaçada pela capacidade dos nematoides das galhas de se adaptarem (Barbary et al., 2016). E com isso, a necessidade de identificação dos mecanismos de defesa adicionais, tais como aqueles iniciados por receptores de reconhecimento (PRRs) de PAMPs/NAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno/nematoide) ou a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno e sinalização de defesa mediada por ácido salicílico (SA) e jasmônico (JA) envolvidas com a resposta PTI (Manosalva et al., 2015).

Em *Arachis*, estudos transcritômicos utilizando o genótipo resistente, *A. stenosperma*, inoculado com *M. arenaria*, identificaram vários genes envolvidos tanto na resposta PTI quanto na ETI, incluindo os genes R, potencialmente envolvidos na resposta de HR (Proite et al., 2007; Tirumalaraju et al., 2011; Guimarães et al., 2010, 2015; Morgante et al., 2013; Bertoli et al., 2016; Clevenger et al., 2017). Da mesma forma, a análise diferencial da expressão gênica aplicada aos genótipos contrastantes de amendoim (*A. hypogaea*), permitiu a identificação de uma resposta imune desencadeada pelo efector e mediada por um gene R no genótipo resistente (Tifguard), herdado da espécie silvestre *A. cardenasii* (Clevenger et al., 2017).

Muitas evidências suportam redes de co-expressão de proteínas e fenótipos emergentes (Vella et al., 2017, Di Silvestre et al., 2018). No entanto, altas taxas de tradução ou transcrição nem sempre são iguais à abundância de proteínas, pois algumas proteínas podem ser traduzidas lentamente, mas muito estáveis, produzindo altas concentrações finais ou vice-versa (Merchante et al., 2017). Assim, a geração de dados proteômicos para apoiar inferências extraídas de estudos transcriptômicos é importante (Swarupa et al., 2016; Garcia-Seco et al., 2017; Zhou et al., 2018).

Até o momento, poucos estudos proteômicos foram conduzidos no gênero *Arachis*, com a maioria dos relatos sobre moléculas específicas de certos tecidos, estágios de desenvolvimento e resposta ao déficit hídrico (Schmidt et al., 2009; Li et al., 2013; Sun et

al., 2013; Zhu et al., 2013; Zhao et al., 2015; Liu et al., 2018; Kottapalli et al., 2009; Akkasaeng et al., 2015; Katam et al., 2016; Thangella et al., 2018; Carmo et al., 2019) e respostas ao estresse biótico (Wang et al., 2012; Kumar e Kirti, 2015b; Zhao et al., 2019).

No presente estudo, 60% dos transcritos de *A. stenosperma* identificados como diferencialmente expressos (DEGs) sob infecção por *M. arenaria* apresentaram a mesma tendência de expressão que sua proteína correspondente. Esta correlação relativamente baixa entre os níveis de mRNA e proteína foi previamente observada para outras espécies ((Shakeel et al., 2013; Kumar et al., 2016; Stare et al., 2017), e reflete um equilíbrio dinâmico entre processos de transcrição e translação, incluindo processamento e degradação de mRNAs, tradução, localização, modificação e destruição programada de proteínas (Vogel & Marcotte, 2012). Uma dessas proteínas PR, a proteína tipo MLP 34 (AsMLP34), foi consistentemente mais abundante nas amostras inoculadas com *M. arenaria* do que no controle e foi selecionada para análise dos efeitos da sua superexpressão *in planta* durante o processo de infecção do nematoide.

5. CONCLUSÃO

A combinação de abordagens transcritômica e proteômica permitiu a identificação de genes/proteínas candidatos envolvidos na resposta de resistência de *A. stenosperma* ao nematoide, *M. arenaria* e uma visão geral das alterações dinâmicas na modulação gênica e proteica em fases iniciais da infecção do nematoide. A maioria dos genes e proteínas identificadas foi induzida mediante a infecção pelo nematoide. Os dados aqui obtidos servirão para um melhor entendimento desses genes/proteínas identificadas nos mecanismos de defesa da planta contra patógeno, bem como na caracterização funcional de novos genes candidatos.

CAPÍTULO 3

Avaliação *in planta* dos genes-candidatos

1. INTRODUÇÃO

As plantas estão, naturalmente, expostas a diversos estresses bióticos e abióticos, podendo ocorrer separados ou simultaneamente, afetando seu crescimento e desenvolvimento (Gassmann et al., 2016). Diante disso, como tentativa de sobrevivência, elas devem ser capazes de perceberem e acionarem diferentes estímulos para responderem de forma adaptativa ao estresse (Jeandroz e Lamotte, 2017). No entanto, apesar da indução de vários mecanismos de defesa, plantas suscetíveis muitas vezes não conseguem sobreviver a determinadas condições de estresse (Ahanger et al., 2017).

A adaptação e sobrevivência das plantas envolvem alterações moleculares e fisiológicas dinâmicas tanto em resposta à seca quanto à infecção por fitopatógenos. Devido à complexidade dos processos genéticos e moleculares envolvidos nas respostas de defesa, eles precisam ser pesquisados mais extensivamente.

Há um esforço científico contínuo para melhorar a tolerância das plantas aos estresses bióticos e abióticos (Bostock et al., 2014), por meio da identificação de genes responsivos ao estresse com subsequente introgressão e superexpressão em espécies cultivadas suscetíveis (Ahanger et al., 2017). Dentre esses esforços está o de tentar elucidar os mecanismos de adaptação e defesa da planta sob atuais mudanças climáticas, sobretudo a seca, para o uso mais eficiente da água disponível (Al-Karaki, 2000), e ao ataque de patógenos, prevalecido pelo aumento da suscetibilidade da planta pelo estresse abiótico ou pela migração de pragas e patógenos devido ao clima local (Dresselhaus e Hückelhoven, 2018).

Vários estudos revelam que estressores bióticos e abióticos compartilham genes e produtos responsivos, bem como sinais comuns (Chan, 2012). Esse crosstalk entre as vias de sinalização associadas a respostas estresse-específicas sugere que diversos mecanismos podem integrar respostas globais ao estresse (Gassman et al., 2014). Isso porque mesmo se tratando de estresses diferentes, eles podem ocasionar danos celulares semelhantes, ativando sinais de respostas por meio de desordem dos canais iônicos, mecanismos osmosensores, desestabilização e ruptura das membranas e produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), assim como a sinalização dos reguladores de fitormônios (Jeandroz e Lamotte, 2017).

Entretanto, apesar de compartilharem vias de sinalização semelhantes, cada estresse altera a expressão de genes de forma genótipo-estresse específico. Isso faz com que o estudo de diferentes estresses seja importante para o entendimento e possível elucidação das complexas respostas de defesa envolvidas, até porque a função precisa de muitos desses genes não é bem conhecida (Chalavi e Raeini-Sarjaz, 2012).

O amendoim é uma cultura alimentar importante, que apresenta estreita base genética quando associado a caracteres de importância econômica e alta suscetibilidade aos estresses bióticos (ataque de fitopatógenos) e abióticos (como a seca). Por outro lado, seus parentes silvestres diploides, expostos naturalmente a condições ambientais adversas e ao estresse biótico, têm sido selecionados durante a evolução e apresentam maior variabilidade genética, sendo uma potencial fonte de alelos de resistência a doenças e à adaptação a diversos ambientes (Bertioli et al., 2011, 2016).

Dentre os parentes silvestre do amendoim do genoma AA, *A. stenosperma* apresenta resistência a várias pragas, incluindo o nematoide das galhas (*Meloidogyne arenaria* raça 1), por meio de reação de hipersensibilidade (Proite et al., 2008), enquanto que *A. duranensis*, apresenta maior tolerância à seca (Leal-Bertioli et al., 2012). Desta forma, ambos os genótipos são interessantes para a identificação de genes relacionados à resistência ao nematoide e tolerância à seca.

Dessa forma, a prospecção de genes/proteínas associados aos estresses de seca e ataque de nematoide tem sido realizada, possibilitando a identificação de um grande número de genes candidatos envolvidos na resposta de defesa da planta durante o déficit hídrico e nos estágios iniciais de interação planta-nematoide incompatível e auxiliando a compreensão genótipo-fenótipo observada. No entanto, a validação desses genes candidatos quanto a sua função necessita ser avaliada *in planta*.

A transformação genética é uma ferramenta efetiva na investigação da função gênica em plantas e também para introgressão de novas características genéticas (Chu et al., 2014; Liu et al., 2016). Alguns genes individuais que conferem características agronômicas já foram transferidos para o amendoim por meio de eletroporação, bombardeamento de partículas (Chu et al., 2008) e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (formação de calos) ou por *A. rhizogenes* (formação de raízes em cabeleiras) (Li et al., 1997; Rohini et al. 2001; Sharma and Bhatnagar-Mathur 2006; Tiwari et al. 2008; Sinharoy et al., 2009; Bhatnagar et al. 2010; Geng et al., 2012; Iqbal et al. 2012; Chu et al., 2014; Liu et al., 2016).

A vantagem da transformação mediada por *A. rhizogenes*, pelo método *ex-vitro*, usando folhas destacadas de amendoim (transformação composta), em relação a *A. tumefaciens*, pelo método de *floral dip* de plantas de *Arabidopsis* (transformação estável), é sua praticidade de execução, baixo custo e tempo curto necessário para produzir e identificar um grande número de eventos de transformação independentes, agilizando a avaliação de genes relacionados à biologia radicular, processos simbióticos e interações estresse-raiz (Cho et al., 2000; Chu et al., 2014; Guimaraes et al., 2017).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da superexpressão de dois genes candidatos (*AdCht2* - quitinase classe II e *AsMLP34* - proteína tipo MLP-34) durante o processo de infecção por *M. arenaria* no amendoim e durante o estresse à seca.

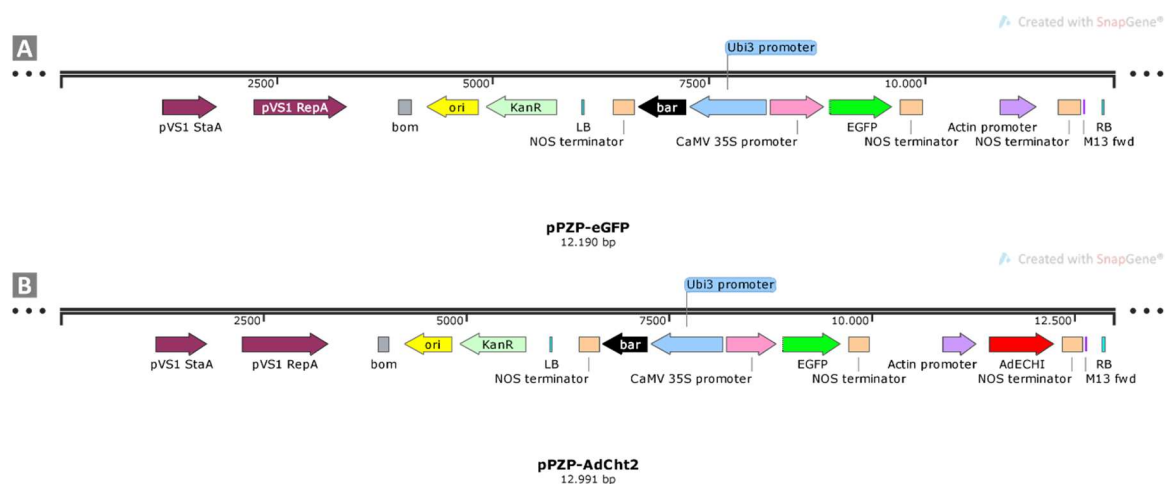
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção de genes candidatos para avaliação da superexpressão *in planta*

Dois genes, um codificando a proteína endoquitinase ácida de 27kDa da classe II (*AdCht2*) e o outro a proteína do tipo MLP34 (*AsMLP34*), pertencentes a família de proteínas PR e, portanto, responsivos a estresse biótico e abiótico, foram selecionados para este estudo.

2.2. Construção do vetor de expressão

Para avaliação do efeito da superexpressão dos dois genes candidatos selecionados em raízes e plantas transgênicas sob estresse hídrico e ataque do nematoide, a região codante dos genes *AdCht2* (795 pb) e *AsMLP34* (462 pb) foi clonada sob o controle do promotor do gene de actina 2 de *Arabidopsis thaliana*, no sítio de restrição *Xho1* do vetor de expressão pPZP-201BK-EGFP (Chu et al., 2014) modificado, pela Epoch Life Science Inc. (Texas, USA) (Figura 19).



(continua na próxima página)

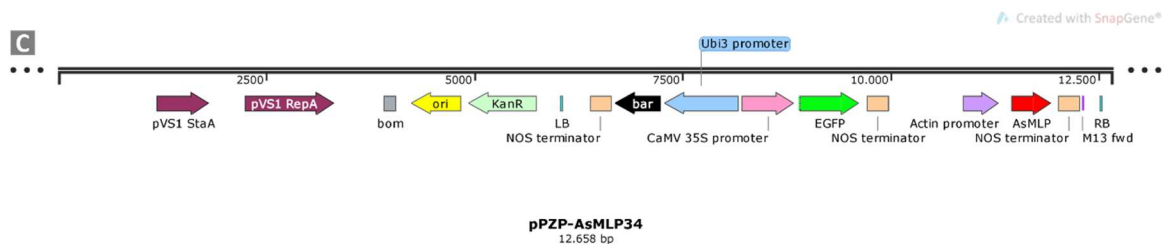


Figura 19 - Mapas dos vetores. A) pPZP_201BK_EGFP. B) pPZP-AdCht2. C) pPZP-MLP34. Imagem criada pelo SnapGene®.

2.3. Transformação de *Agrobacterium* spp. com os genes candidatos

As linhagens K599 de *A. rhizogenes* e GV3101 de *A. tumefaciens* foram transformadas com os vetores pPZP-eGFP, pPZP-AdCht2 e pPZP-AsMLP34 por eletroporação, plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) contendo estreptomicina (100mg/mL) e canamicina (80mg/mL) e incubadas a 28°C por 48h, segundo Lacorte e Romano (2015). A confirmação da transformação deu-se pela realização de uma PCR de colônia, utilizando-se os *primers* para os genes de virulência (*VIRD2* – *Foward*: ATGCCCGATCGAGCTCAAGT e *Reverse*: CTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA) (Haas et al, 1995), *eGFP* (*Foward* – CCATCTTCTTCAAGGACGAC e *Reverse* - GGTGTTCTGCTGGTAGTGGT), *AdCht2* (sequências disponíveis na tabela 1 do capítulo 1) e *AsMLP34* (sequências disponíveis na tabela suplementar 3 do capítulo 2). As reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen™), conforme instruções do fabricante, e submetidas a 94°C por 5 minutos, para uma desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos repetitivos de amplificação: 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, e a um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, não desnaturante, corado com brometo de etídio.

As colônias de *A. rhizogenes* e *A. tumefaciens* que amplificaram os genes candidatos, VIR e eGFP, foram multiplicadas em 3 mL de meio LB líquido contendo estreptomicina (100 mg/L) e canamicina (100 mg/L), para transformações com *A. rhizogenes*, ou gentamicina (50 mg/L) e canamicina (100 mg/L), para transformações com *A. tumefaciens*, e incubadas a 28°C durante toda a noite (*overnight*) para preparo do estoque glicérol. A pasta bacteriana de *A. rhizogenes* utilizada para transformação das folhas destacadas foi preparada como descrito por Guimaraes e colaboradores (2017). Já a suspensão bacteriana de *A. tumefaciens*, utilizada para transformação de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia 0 (Col. 0), foi preparada de acordo com Clough e Bent (1998).

2.4. Transformação de folha destacada de *Arachis hypogaea* com *Agrobacterium rhizogenes*

Folhas de *A. hypogaea* cv. Runner IAC-866, cultivadas em câmara de crescimento, foram destacadas e mantidas em frasco contendo água destilada até o momento da transformação. Trinta pecíolos de folhas destacadas (FDs) foram transformados com a linhagem K599 de *A. rhizogenes* para cada um dos três vetores construídos (pPZP-201BK-eGFP, pPZP-AdCht2 e pPZP-AsMLP34). A região perfurada do pecíolo foi imediatamente coberta com algodão umedecido afim de manter a umidade na região da inoculação. As folhas foram então acondicionadas em placas de Petri contendo algodão, papel filtro e uma lâmina de vidro para sustentar os folíolos e evitar o contato deles com o papel úmido da placa, como descrito por Guimaraes e colaboradores (2017). Todas as placas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro a 24°C, sendo aguadas sempre que necessário para manter a umidade da placa, até o surgimento das raízes transgênicas.

2.5. Avaliação da infecção do nematoide em raízes transgênicas

Trinta dias após inoculação (DAI) de *A. rhizogenes* em folhas destacadas de *A. hypogaea*, todas as raízes eGFP negativas (sem emissão da fluorescência da eGFP), avaliadas em lupa estereoscópica (Leica – M205 FA) sob luz branca e luz ultravioleta (UV), foram removidas. As raízes restantes (eGFP positivas) foram cobertas com vermiculita e inoculadas com 1000 J2 de *M. arenaria* raça 1 (obtidos conforme descrito por Hussey e Barker, 1973).

A avaliação do número de fêmeas em todas as raízes transgênicas, desenvolvidas e inoculadas com o nematoide, foi realizada aos 60 dias após inoculação (DAI) do nematoide, sob lupa estereoscópica pela técnica de clarificação com NaClO e coloração com fucsina ácida (Byrd et al., 1983). O peso das raízes avaliadas também foi registrado. O teste t foi aplicado para determinar a significância ($p \leq 0,05$) dos resultados obtidos entre o número de galhas observadas e o peso das raízes avaliadas.

2.6. Transformação de *Arabidopsis thaliana* com *Agrobacterium tumefaciens*

Botões florais ainda fechados de plantas de *A. thaliana*, cultivadas em câmara de crescimento, foram submergidos em frascos contendo suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* transformadas com o gene de interesse. Essas plantas então foram mantidas por uma semana, em recipientes fechados, até a repetição desse processo de

transformação realizado com os novos botões florais que surgiram após a primeira transformação. Todas as plantas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas a 21°C, sendo aguadas de dois em dois dias, até a secagem completa das sílicas. As sementes (T0) foram coletadas, semeadas em substrato e selecionadas a partir da aplicação de glufosinato de amônio. As plantas que sobreviveram a esta seleção e que apresentavam emissão da fluorescência verde de eGFP (controle positivo de transformação), em microscópio óptico sob luz UV, foram transplantadas, individualmente, mantidas em câmara de crescimento sob as mesmas condições acima descritas, até secagem das sílicas. Sementes da geração T1 foram coletadas, semeadas e selecionadas pela aplicação do glufosinato de amônio. Cada planta T1 selecionada representava uma linhagem diferente, dando origem a sementes da geração T2. Essas linhagens T2 foram também submetidas ao mesmo processo de semeadura e seleção, agora para identificação de linhagens homozigóticas.

2.7. Avaliação das plantas transgênicas de *A. thaliana* sob estresse hídrico

Para o experimento do tipo *dry-down* (diminuição gradual de água no solo), diferentes linhagens de plantas T2 de *A. thaliana* contendo o gene *AdCht2*, foram semeadas em substrato e depois transplantadas, individualmente, para copos plásticos de 200 mL, contendo uma mistura de areia e substrato (1:1). Cinco plantas de quatro linhagens diferentes de *AdCht2*, e dez plantas controle (não transformadas) de Col. 0, com aproximadamente 45 dias de idade, foram colocadas em capacidade de campo. Ao atingirem 70% da capacidade de campo, cinco plantas Col. 0 continuaram sendo irrigadas durante todo o experimento, enquanto que as demais plantas tiveram sua irrigação suspensa até o fim do experimento, quando da morte das mesmas. O experimento durou 13 dias, nos quais as plantas foram monitoradas de dois em dois dias, possibilitando o acompanhamento da perda de água do solo, registrado, gravimetricamente, pela pesagem das mesmas.

2.8. Avaliação da expressão gênica

Os níveis de expressão endógena dos genes candidatos selecionados (*AdCht2* e *AdsMLP34*) para avaliação dos efeitos da superexpressão *in planta*, foram examinados por RT-qPCR em raízes de plantas de *A. duranensis* submetidas à seca e em raízes de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria* (Tabela 4).

3. RESULTADOS

3.1. Seleção dos genes candidatos para avaliação *in planta*

Como mostrado nas figuras 10 (MLP34 - *spots* 257 e 266; *spot* 291 - Cht2) do capítulo 1 e 18 do capítulo 2 (MLP34), os genes candidatos selecionados foram responsivos à seca e ao ataque do nematoide, respectivamente. A expressão desses dois genes candidatos foi avaliada tanto em raízes de *A. duranensis* estressada pelo déficit hídrico, quanto em raízes de *A. stenosperma* inoculadas com *M. arenaria*, a fim de verificar sua modulação mediante a estresses diferentes (Figura 20).

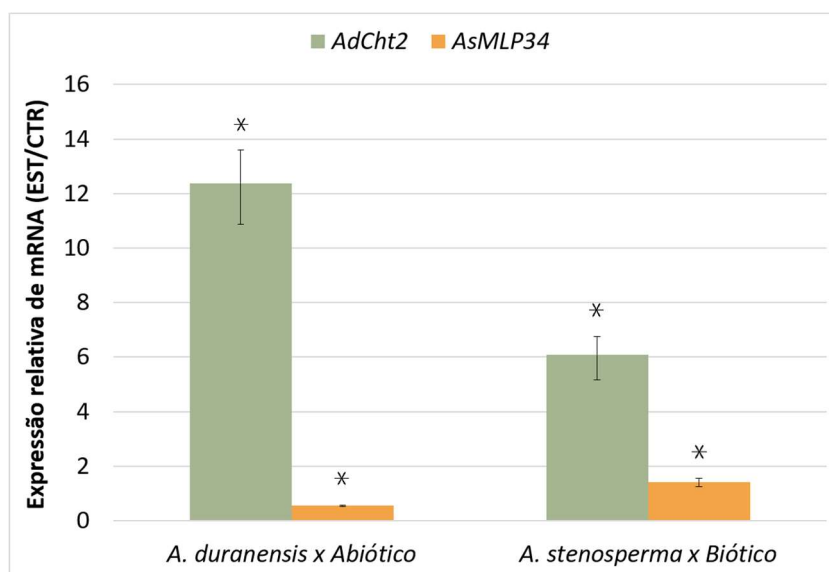


Figura 20 - Gráfico de expressão relativa dos genes candidatos selecionados para superexpressão em plantas transgênicas. A esquerda: nível de expressão de *AdCht2* e *AsMLP34* em raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico. **A direita:** nível de expressão de *AdCht2* e *AsMLP34* em raízes de *A. stenosperma* inoculadas com nematoide. Expressão relativa de mRNA de amostras tratadas (estressada ou inoculada), comparadas às amostras controle. (*) indica significância a 95% ($p \leq 0,05$).

3.2. Transformações das linhagens de *Agrobacterium* spp

Os vetores pPZP-*AdCht2* e pPZP-*AsMLP34* foram introduzidos por eletroporação nas linhagens K599 de *A. rhizogenes* e GV3101 de *A. tumefaciens*. A transformação foi confirmada por meio de PCR de colônia (três colônias de cada gene, crescidas em meio seletivo) e pela amplificação dos transcritos referentes aos genes de virulência (*VIR*), *eGFP*, *AsMLP34* e *AdCht2* (Figura 21). Apenas uma das colônias positivas acima citadas, para cada um dos genes foi utilizada para fazer o estoque glicérol.

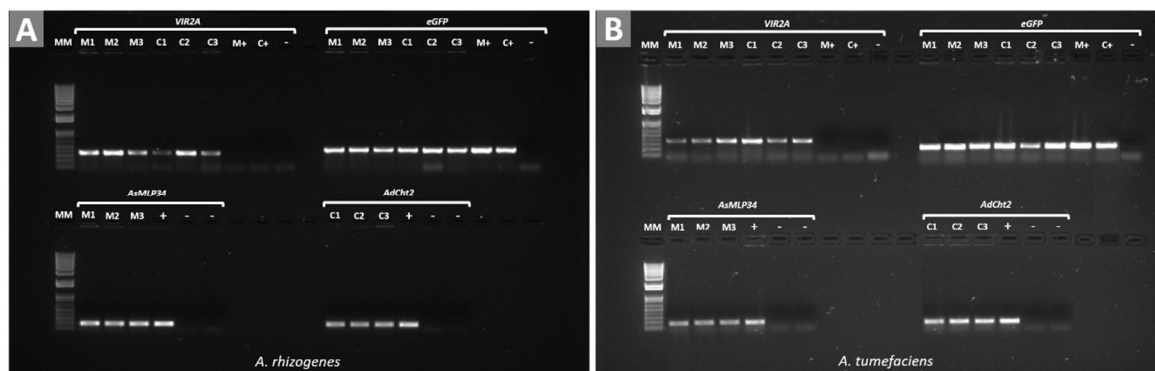


Figura 21 – Gel de agarose (1,5%) com os produtos de amplificação por PCR de colônia para confirmação da transformação das *Agrobacterias* com os vetores pPZP-AsMLP34 e pPZP-AdCht2, utilizando os primers para os genes de virulência (*VIR* - 338pb), *eGFP* (350pb), *AsMLP34* (198pb) e *AdCht2* (173pb). **A)** Transformação em *A. rhizogenes* K599. **B)** Transformação de *A. tumefaciens* GV3101. MM: marcador molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™). M: transformação feita com pPZP-AsMLP34. C: transformação feita com pPZP-AdCht2. 1-3) Três diferentes colônias utilizadas para confirmação da transformação. (+): Controle positivo (plasmídeo). (-): Controle negativo.

3.3. Transformação de folhas destacadas de *Arachis* com *AdCht2* e *AsMLP34* e avaliação de seu efeito na resistência ao nematoide das galhas

Cerca de 20 dias após a transformação das folhas destacadas de *A. hypogaea* com *A. rhizogenes*, todas as raízes desenvolvidas foram avaliadas em lupa sob luz UV para confirmação da transformação (Figura 22) e inoculadas com *M. arenaria*.

A infecção foi avaliada 60 dias após a inoculação (DAI) dos nematoides e mostrou uma significativa redução de 38% e 36% (Teste t - $p \leq 0,05$), na quantidade de fêmeas por grama de raiz transgênica superexpressando o gene *AdCht2* e *AsMLP34* em relação a raízes transformadas com o vetor vazio (*eGFP*), respectivamente (Figuras 23-24).

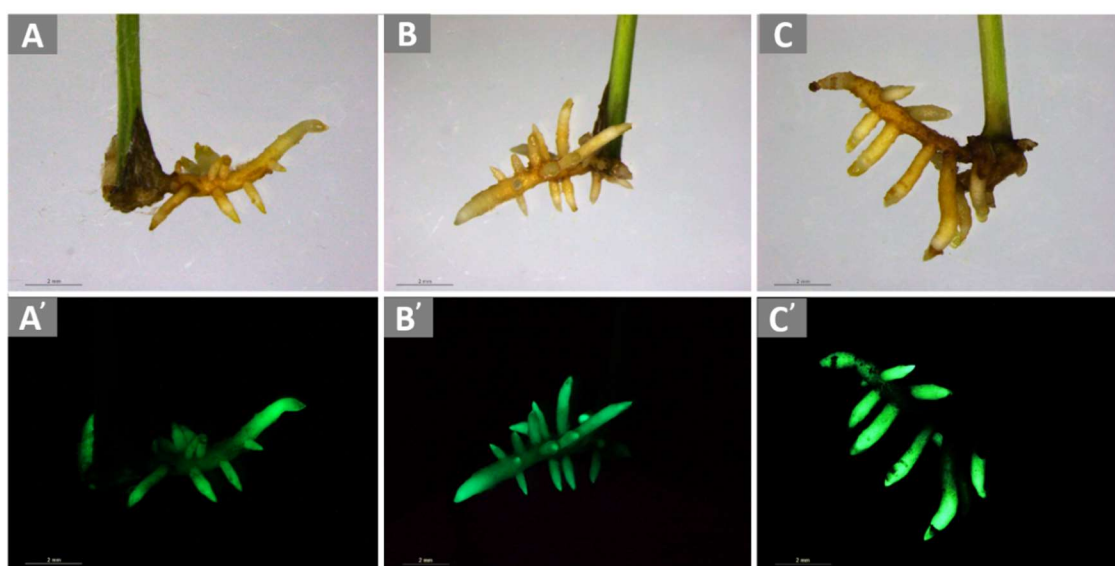


Figura 22 - Imagens ilustrativas de raízes transgênicas induzidas por *A. rhizogenes* em folhas de amendoim e o efeito da superexpressão dos genes *eGFP*, *AsMLP34* e *AdCht2* na quantidade de galhas por grama de raiz avaliada. **A-C)** Folhas destacadas de amendoim com raízes transgênicas em cabeleira

observadas na lupa sob luz branca. **A'-C')** Raízes transgênicas observadas na lupa sob UV. A) Raízes com pZP-eGFP. B) Raízes com pZP-AdCht2. C) Raízes com pZP-AsMLP34. Imagens por Andressa da C. Q. Martins.

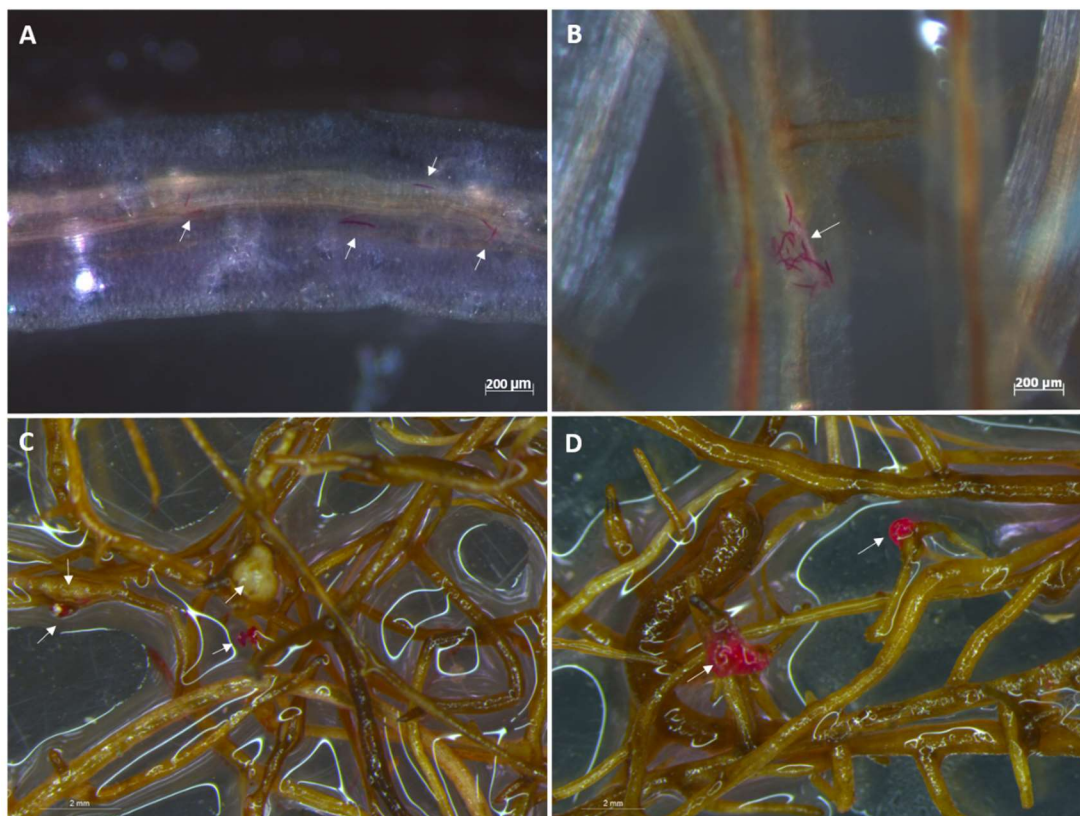


Figura 23 - Infecção por *M. arenaria* raça 1 em raízes transgênicas (pZP-eGFP) induzidas por *A. rhizogenes* a partir de folhas destacadas de *A. hypogaea*, por meio do processo de coloração dos nematoides com fucsina ácida e das massas de ovos com floxina B. (A-B) Juvenis do estágio 2 (J2), corados com fucsina ácida (em rosa), penetrando as raízes transgênicas, 6 DAI. (C-D) Massas de ovos coradas com floxina B (em rosa) em raízes transgênicas, 60 DAI. (C) Galhas sem coloração, representada por intumescimentos em algumas regiões radiculares, 60 DAI. Raízes observadas na lupa sob luz branca. DAI: dias após a inoculação do nematoide. Imagens (A-B) por Andressa da C. Q. Martins e (C-D) por Bruna Medeiros Pereira.

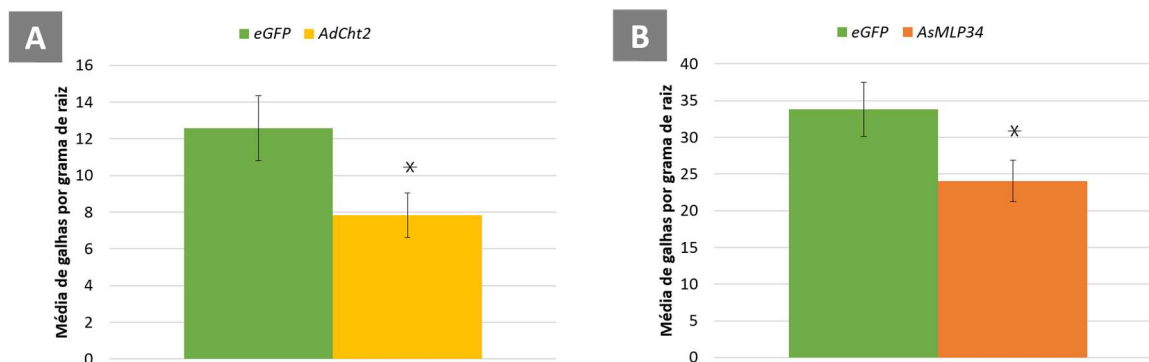


Figura 24 - Gráficos comparativos com o número médio de galhas por grama de raízes transgênicas obtidas a partir de folhas destacadas de amendoim. A) Valores médios obtidos a partir de raízes transformadas com pZP-eGFP e pZP-AdCht2. B) Valores médios obtidos a partir de raízes transformadas com pZP-eGFP e pZP-AsMLP34 (30 folhas destacadas por genes). (*): valor de $p \leq 0,05$.

3.4. Transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* com *AdCht2* e *AsMLP34* e análise na tolerância à seca

Com o objetivo de avaliar os efeitos da superexpressão dos genes *AdCht2* e *AsMLP34* sob a diminuição gradual de água no solo, plantas de *A. thaliana* (Col. 0) foram transformadas com os respectivos genes. Porém, até o momento, apenas plantas transformadas com o gene *AdCht2* chegaram na geração T2 e puderam ser testadas tanto ao ataque do nematoide (experimento em andamento) quanto a imposição do estresse hídrico (seca).

Neste estudo, plantas de *A. thaliana* transgênicas superexpressando o gene *AdCht2* e não transgênicas (Col. 0) foram submetidas a diminuição gradual de água no solo, com a suspensão da irrigação. Isso ocasionou a perda de água do solo por evaporação e diminuição do peso dos copos (Figura 25A). Com uma quantidade cada vez menor de água disponível no solo, logo foi possível ver os sintomas típicos de déficit hídrico: murcha e dessecação das folhas das plantas estressadas, em especial, das linhagens transgênicas (Figura 25B).

Apesar do gene *AdCht2* ter sido 12 vezes mais expresso em plantas estressadas do que em plantas controle (Col 0) e de aparecer como uma proteína exclusiva de plantas estressadas, a avaliação de linhagens transgênicas de *AdCht2* em relação as plantas não transformadas (Col. 0), demonstrou que a superexpressão de *AdCht2* em plantas de *Arabidopsis* não teve efeito sobre o perfil de transpiração dessas plantas ou sobre a sua tolerância à seca (Figuras 24 e 25).

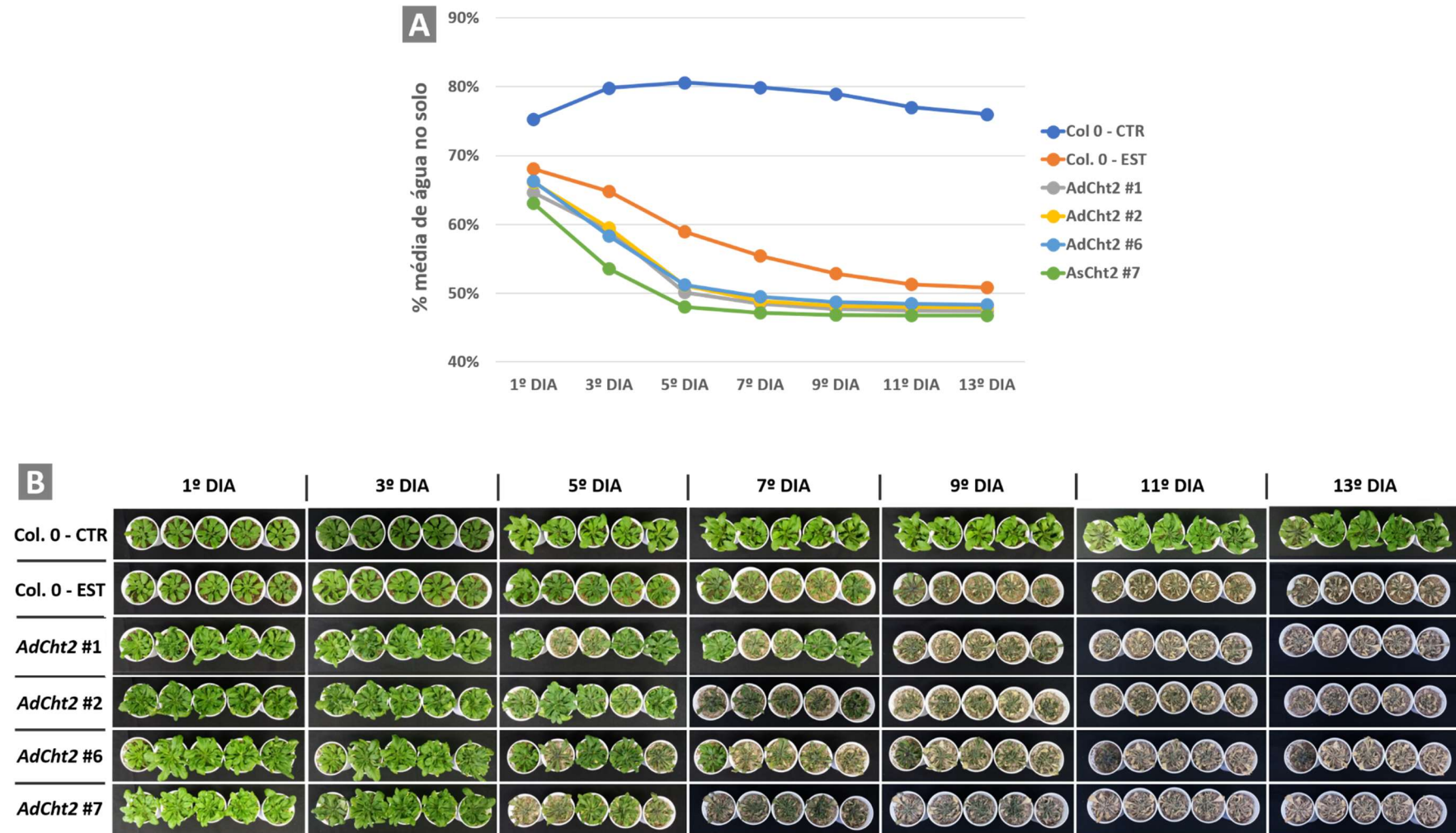


Figura 25 – Plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AdCht2* submetidas à diminuição gradual de água no solo (*dry-down*). A) Porcentagem média de água no solo durante os 13 dias de experimento de *dry-down*. B) Visão geral do fenótipo da parte aérea de plantas transformadas (*AdCht2*) e não transformadas (Col. 0) ao longo do experimento de *dry-down*. Imagens por Andressa a C. Q. Martins.

4. DISCUSSÃO

Usando abordagens de análises transcritômica e proteômica, foi possível a identificação de genes e proteínas diferencialmente modulados e potencialmente envolvidos na resposta adaptativa e de resistência ao estresse em *A. duranensis* (sob o estresse hídrico) e em *A. stenosperma* (inoculada com o nematoide das galhas, *M. arenaria*). Vários genes candidatos e que poderiam ser melhor caracterizados quanto ao seu papel mediante ao estresse, puderam ser identificados neste estudo. Dentre eles, dois genes que codificam as proteínas endoquitinase ácida de 27 kDa (quitinase da classe II – AdCht2) e proteína tipo MLP-34 (AsMLP34) foram selecionados para clonagem e avaliação dos efeitos da sua superexpressão durante o processo de infecção pelo nematoide e durante o estresse hídrico por meio da diminuição gradual de água no solo (*dry-down*).

De acordo com a ferramenta Mercator de anotação e categorização de funções atribuídas, ambas as proteínas (AdCht2 e AsMLP34) foram classificadas como responsivas aos estresses biótico e abiótico. Essas duas proteínas pertencem a família das proteínas relacionadas à patogênese (PRs), que estão associadas à resistência sistêmica adquirida (SAR) ou à resposta de hipersensibilidade (HR) (Jain e Khurana, 2018).

A proteína endoquitinase ácida de 27kDa (AdCht2) foi aqui identificada exclusivamente abundante em raízes de *A. duranensis* submetidas ao estresse hídrico do tipo *dry-down*. Seu transcrito correspondente, sob mesmas condições de estresse hídrico em *A. duranensis* e sob infecção do nematoide em *A. stenosperma* inoculada com *M. arenaria*, foi positivamente regulado em nível transcricional (RNA-Seq e RT-qPCR). Como já discutido no capítulo 1, essas quitinases estão associadas a respostas de defesa a patógenos e tolerância a estresses abióticos, com vários estudos mostrando o aumento nos níveis transcricionais e traducionais da quitinase sob condições de seca (Grover, 2012; Ye et al., 2015; Li et al., 2018; Katam et al., 2016) e sob o ataque de patógenos (Su et al., 2015; Richa et al., 2016; Rawat et al., 2017; Xu et al., 2018).

No entanto, a superexpressão de *AdCht2* em plantas de *Arabidopsis*, não conferiu tolerância ao estresse hídrico. É possível, ainda, observar um fenótipo de área foliar diferente entre plantas transgênicas (*AdCht2*) e não transgênicas (Col. 0). Todas as linhagens transgênicas apresentaram maior crescimento da aérea foliar quando comparadas à Col. 0 (Figura 26). Um aumento significativo do crescimento de plantas de morango superexpressando um gene da quitinase em comparação com plantas não transgênicas, também foi observado por Chalavi e Raeini-Sarjaz (2012), mas diferente do caso aqui observado, esse aumento não prejudicou a tolerância ao estresse hídrico. Pode ser que o aumento da área foliar de plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene da

AdCht2 tenha influenciado significativamente a taxa fotossintética, pelo aumento da condutância estomática, e na perda mais rápida de água por transpiração da planta, seja por haver uma área maior para trocas gasosas ou por uma deficiência no fechamento estomatal.



Figura 26 - Imagem ilustrativa da diferença observada entre o tamanho da parte aérea das plantas de *A. thaliana*. (A) Plantas não transformadas. (B-C) Duas linhagens diferentes de plantas superexpressando o gene *AdCht2*. As sementes de todas essas plantas foram colocadas para germinar no mesmo dia e sob as mesmas condições. Imagem por Andressa da C. Q. Martins.

O mecanismo de ação da quitinase durante o déficit hídrico ainda não é claro, porém uma hipótese para a indução desse gene sob esse estresse é de que ele possa constituir uma defesa preventiva a planta, como uma barreira bioquímica aos patógenos (Hong e Hwang, 2002). Sob déficit hídrico as plantas tornam-se mais suscetíveis ao ataque do patógeno (Simpson, 1981) e podem ter adaptado mecanismos de defesa contra o patógeno, induzíveis pela seca, como hipotetizado por Chen e colaboradores (1994). Guo e colaboradores (2013), consideram que a proteína DIP3 (proteína induzida pela seca e que codifica uma quitinase da classe III) possa ser responsiva à seca, exercendo papéis na formação ou manutenção da parede celular.

Com relação a diminuição da infecção pelos nematoide em raízes transgênicas de folhas destacadas, superexpressando *AdCht2*, uma hipótese é que esse gene esteja realmente envolvido no desenvolvimento de uma barreira protetiva ao ataque do patógeno, como já especulado por Hong e Hwang (2002). A maioria dos estudos sobre a ação da quitinase no aumento da resistência ao patógeno, está associada à resistência à fungos. Mercer e colaboradores (1992) verificaram que a quitinase pode degradar a quitina contida nas cascas de ovos dos nematoides, podendo ocasionar eclosão prematura dos ovos, interferindo, assim, no desenvolvimento do patógeno.

O outro gene candidato superexpressado e aqui avaliado foi o que codifica a proteína do tipo MLP-34 (*AsMLP34*). Assim como já discutido em maiores detalhes nos capítulos 1 e 2, as proteínas do tipo MLP (*Major Latex Protein*) são exclusivas de plantas, pertencem a uma subclasse da família Bet v I da superfamília das proteínas relacionadas á patogênese (PRs) e desempenham papéis importantes na adaptação e defesa aos estresses bióticos e abióticos (Kim et al., 2005; Lytle et al., 2009; Chen e Dai, 2010).

A partir das análises realizadas e apresentadas neste estudo, pode-se observar a indução de duas isoformas de MLP34 nos dois estresses avaliados com *A. duranensis* e *A. stenosperma*. Uma das duas isoformas identificadas em raízes de plantas de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico apresentou níveis proteicos aumentados, assim como a isoforma identificada em raízes de *A. stenosperma* inoculada com nematoide, em relação aos seus controles. No entanto, em relação aos níveis transcricionais, as duas isoformas identificadas em *A. duranensis* sob estresse abiótico foram negativamente reguladas, enquanto que a isoforma identificada em *A. stenosperma* sob estresse biótico, foi positivamente regulada. Isso sugere que a modulação deste gene é genótipo-estresse-isoforma específico. A presença de isoformas distintas confere a proteína diversidade de função e diversidade regulatória (Eksi et al., 2013).

Plantas de *A. thaliana* transgênicas superexpressando o gene *AsMLP34* ainda não foram selecionadas para homozigose, inviabilizando a análise dos efeitos deste gene durante o déficit hídrico. Porém, mesmo não sendo possível esta avaliação, outros pesquisadores testaram a resposta de genes *MLPs* sob estresses abióticos. Wang e colaboradores (2016) verificaram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando uma *MLP43*, apresentaram tolerância à seca, funcionando como um regulador positivo durante a resposta a ABA. Rupert e colaboradores (2002) verificaram que *MLP* é negativamente regulado sob tratamento com etileno.

Zhang e colaboradores (2018), observaram que o perfil de expressão de diversos genes de uva (*Vitis vinifera*) que codificam proteínas *VvMLPs* variou bastante mediante as respostas aos estresses (frio, calor e sal) ou tratamento com aplicação de fitormônios (ABA, MeJA e SA), sugerindo que os papéis fisiológicos desses possam ser bem distintos. Há ainda diferenças de expressão de genes *VvMLP* genótipo-tecido específico, o que também foi observado nos resultados aqui obtidos com os genes de proteínas tipo MLP de *Arachis* spp., provavelmente associados a diferenciação funcional desses genes.

Vários estudos têm sugerido que as *MLPs* sejam necessárias nas respostas de defesa da planta ao estresse biótico (Schenk et al., 2000; Malter e Wolf, 2011; Wang et al., 2011; Chen et al., 2015; Yang et al., 2015), devido a indução de genes *MLPs* mediante a infecção de patógenos em algodão, eucalipto, amoreira (Down et al., 2004; Chen et al.,

2015; Gai et al., 2018), assim como a resposta a moléculas sinalizadoras de defesa, como etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico.

A superexpressão do gene *AsMLP34* em raízes transgênicas de folhas destacadas de amendoim inoculadas com *M. arenaria*, reduziu em 36% a quantidade média de galhas por grama de raiz analisada, valor próximo a redução obtida pela superexpressão de *AdCht2*. Gai e colaboradores (2018) também verificaram que a superexpressão do gene *MuMLP329* de amoreira (*Morus* spp.) em *Arabidopsis* produziu resistência a patógenos (Gai et al., 2018). Mas os efeitos da superexpressão de *MLP* na resistência a patógenos pode ser variável, como o observado para diferentes genes *MLP* de algodão contra *Verticillium dahliae* (Yang et al., 2015; Zhang et al., 2012; Wang et al., 2011; Chen e Dai, 2010).

Como visto, as diversas MLPs parecem exercer papéis comuns ou específicos na resposta de adaptação e defesa da planta frente aos estresses bióticos e abióticos. Dessa forma, sugere-se que o estudo da interação de *AsMLP34* com outras proteínas possivelmente associadas a vias de sinalização e resposta de defesa, da sua modulação mediante a imposição de diferentes estresses e tratamentos, assim como a identificação de genes possivelmente modulados pela superexpressão de *AsMLP34* possam ser interessantes para esclarecer seu papel na resposta de defesa de *A. stenosperma* contra *M. arenaria*.

O estudo mais detalhado da estrutura gênica, perfil de expressão sob diversos estresses, bem como as interações com outras proteínas, podem guiar ao entendimento do potencial papel nos mecanismos de defesa aos quais esses genes estão envolvidos, auxiliando no desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência individual ou múltipla mais duradouras aos estresses ambientais.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A superexpressão dos genes *AdCht2* (endoquitinase ácida de 27kDa) e *AsMLP34* (proteína do tipo MLP-34), identificados como diferencialmente responsivos, tanto ao estresse abiótico (déficit hídrico), quanto biótico (nematoide), em espécies silvestres de *Arachis*, reduziu significativamente (38% e 36%, respectivamente) a quantidade média de galhas por grama de raiz transgênicas inoculadas com o nematoide das galhas (*M. arenaria*). A superexpressão de *AdCht2* não conferiu nenhuma resposta de tolerância à seca. Uma alternativa é o uso de um método de co-expressão de genes associados à resposta adaptativa para a reversão do fenótipo observado, como a piramidação de *AdCht2* e *AsMLP34*.

Além disso, como o papel de *AdCht2* e *AsMLP34* ainda não estão bem estabelecidos nos processos de resposta adaptativa e de defesa da planta, fazem-se necessários outros estudos tais como: a avaliação da expressão desses genes em plantas de *Arachis* spp. sob diferentes tratamentos (H_2O_2 , ABA, MeJA, SA, ET) a fim de se identificar a quais vias de sinalização são responsivos. Pode-se também, examinar os efeitos da superexpressão desses genes no acúmulo de H_2O_2 e os níveis de expressão de genes envolvidos na eliminação das ROS (APX, CAT, SOD, GST), outros associados às vias de sinalização dos fitormônios.

Os demais genes/proteínas aqui identificados poderão servir como alvos de investigações futuras quanto ao seu envolvimento e resposta de defesa da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, P. K., Babu, K., Saini, N. (2015). Omics of model plants. In: Barh, D., Khan, M. S., Davies, E. (Eds.), *PlantOmics: The Omics of Plant Science*. Springer Science+Business Media, pp. 1-32.
- Ahanger, M. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Ahmad, P. (2017). Plant responses to environmental stresses-from gene to biotechnology. *AoB Plants*, 9(4):plx025.
- Akkasaeng, C., Tantisuwichwong, N., Ngamhui, N. O., Roytrakul, S., Jogloy, S., Pathanothai, A. (2015). Changes in protein expression in peanut leaves in the response to progressive water stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 18(1):19-26.
- Ali, M. A., Anjam, M. S., Nawaz, M. A., Lam, H-M., Chung, G. (2018). Signal transduction in plant–nematode interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6):E1648.
- Al-Karaki, G. N. (2000). Growth, water use efficiency, and sodium and potassium acquisition by tomato cultivars grown under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 23(1):1-8.
- Anders, S., McCarthy, D. J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G. K., Huber, W., Robinson, M. D. (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols*, 8(9):1765-1786.
- Archidona-Yuste, A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Liébanas, G., Rapoport, H. F., Castillo, P., Palomares-Rius, J. E. (2018). Diversity of root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* Goëldi, 1892 (Nematoda: Meloidogynidae) associated with olive plants and environmental cues regarding their distribution in southern Spain. *PLoS ONE*, 13(6):e0198236.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., Boatwright, J. S., Borges, L. M., Brown, G. K., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K.-F., Clark, R. P., Conceição, A. S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K. G., Doyle, J. J., Duminil, J., Egan, A. N., Estrella, M., Falcão, M. J., Filatov, D. A., Fortuna-Perez, A. P., Fortunato, R. H., Gagnon, E., Gasson, P., Rando, J. G., Tozzi, A. M. G. A., Gunn, B., Harris, D., Haston, E., Hawkins, J. A., Herendeen, P. S., Hughes, C. E., Iganci, J. R. V., Javadi, F., Kanu, S. A., Kazempour-Osaloo, S., Kite, G. C., Klitgaard, B. B., Kochanowski, F. J., Koenen, E. J. M., Kovar, L., Lavin, M., Roux, M., Lewis, G. P., Lima, H. C., López-Roberts, M. C., Mackinder, B., Maia, V. H., Malécot, V., Mansano, V. F., Marazzi, B., Mattapha, S., Miller, J. T., Mitsuyuki, C., Moura, T., Murphy, D. J., Nageswara-Rao, M., Nevado, B., Neves, D., Ojeda, D. I., Pennington, R. T., Prado, D. E., Prenner, G., Queiroz, L. P., Ramos, G., Filardi, F. L. R., Ribeiro, P. G., Rico-Arce, M. L., Sanderson, M. J., Santos-Silva, J., São-Mateus, W. M. B., Silva, M. J. S., Simon, M. F., Sinou, C., Snak, C., Souza, E. R., Sprent, J., Steele, K. P., Steier, J. E., Steeves, R., Stirton, C. H., Tagane, S., Torke, B. M., Toyama, H., Cruz, D. T., Vatanparast, M., Wieringa, J. J., Wink, M., Wojciechowski, M. F., Yahara, T., Yi, T., Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny - The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, 66(1):44-77.
- Bai, J., Pennill, L. A., Ning, J., Lee, S. W., Ramalingam, J., Webb, C. A., Zhao, B., Sun, Q., Nelson, J. C., Leach, J. E., Hulbert, S. H. (2002). Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Research* 12(12), 1871-1884.
- Bakker, E. G., Toomajian, C., Kreitman, M., Bergelson, J. (2006). A genome-wide survey of R gene polymorphisms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18(8), 1803-1818.
- Balagué, C., Gouget, A., Bouchez, O., Souriac, C., Haget, N., Boutet-Mercey, S., Govers, F., Roby, D., Canut, H. (2017). The *Arabidopsis thaliana* lectin receptor kinase LecRK-I.9 is required for full resistance to *Pseudomonas syringae* and affects jasmonate signalling'. *Molecular Plant Pathology*, 18(7):937-948.

- Banavath, J. N., Chakradhar, T., Pandit, V., Konduru, S., Guduru, K. K., Akila, C. S., Podha, S., Puli, C. O. R. (2018). Stress inducible overexpression of *AtHDG11* leads to improved drought and salt stress tolerance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Frontiers in Chemistry*, 6:34.
- Barcala, M., García, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., García-Casado, G., Solano, R., Fenoll, C., Escobar, C. (2010). Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant Journal* 61(4), 698-712.
- Bendezu, I. F., Starr, J. L. (2003). Mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the peanut cultivar COAN. *Journal of Nematology* 35(1), 115-118.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57(1), 289-300.
- Berne, S., Jarvonik, B. (2016). Signalling crosstalk of plant defence responses to xylem-invading pathogens. In: Shanker, A. K., Shanker, C. (Eds.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent advances and Future Perspectives*. InTech, pp. 411-440. Acessado em setembro de 2016, disponível em InTechOpen: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-and-biotic-stress-in-plants-recent-advances-and-future-perspectives/signalling-crosstalk-of-plant-defence-responses-to-xyleminvading-pathogens>.
- Bertioli, D. J., Cannon, S. B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A. D., Cannon, E. K. S., Liu, X., Gao, D., Clevenger, J., Dash, S., Ren, L., Moretzsohn, M. C., Shirasawa, K., Huang, W., Vidigal, B., Abernathy, B., Chu, Y., Niederhuth, C. E., Umale, P., Araújo, A. C. G., Kozik, A., Kim, K. D., Burow, M. D., Varshney, R. V., Wang, X., Zhang, X., Barkley, N., Guimarães, P. M., Isobe, S., Guo, B., Liao, B., Stalker, H. T., Schmitz, R. J., Scheffler, B. E., Leal-Bertioli, S. C. M., Xun, X., Jackson, S. A., Michelmore, R., Ozias-Akins, P. (2016). The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature Genetics*, 48(4):438-446.
- Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. C., Madsen, L. H., Sandal, N., Leal-Bertioli, S. C. M., Guimarães, P. M., Hougaard, B. K., Fredslund, J., Schauser, L., Nielsen, A. M., Sato, S., Tabata, S., Cannon, S. B., Stougaard, J. (2009). An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. *BMC Genomics* 10(45), 11 p.
- Bertioli, D. J., Seijo, G., Freitas, F. O., Valls, J. F. M., Leal-Bertioli, S. C. M., Moretzshon, M. C. (2011). An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 9(1):134-149.
- Bhatnagar, M., Prasad, K., Bhatnagar-Mathur, P., Narasu, M. L., Waliyar, F., Sharma, K. K. (2010). An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports* 29(5), 495-502.
- Bhattarai, K. K., Xie, Q-G., Mantelin, S., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D. A., Kaloshian, I. (2008). Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 21(9):1205-1214.
- Bird, A. F., J. Bird. (1991). *The structure of nematodes*. 2nd Edition. San Diego: Academic Press. 316 p.
- Bird, D., Opperman, C., Williamson, V. (2009). Plant infection by root-knot nematode. In: Berg, R. H., Taylor, C. G. (Eds.), *Cell Biology of Plant Nematode Parasitism, Series: Plant Cell Monograph* 15. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 1-14.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. Publicado pela primeira vez online, em 01 de abril, p. 7.
- Bostock, R. M., Pye, M. F., Roubtsova, T. V. (2014). Predisposition in plant disease: Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1):517-549.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2), 248-254.
- Brasileiro, A. C. M., Araujo, A. C. G., Leal-Bertioli, S. C. M. and Guimarães, P. M. (2014). Genomics and genetic transformation in *Arachis*. *International Journal of Plant Biology & Research*, 2(3):1017.
- Brasileiro, A. C. M., Morgante, C. V., Araújo, A. C. G., Leal-Bertioli, S. C. M., Silva, A. K., Martins, A. C. Q., Vinson, C. C., Santos, C. M. R., Bonfim, O., Togawa, R. C., Saraiva, M. A. P., Bertioli, D. J., Guimarães, P. M. (2015). Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 33(6), 1876-1892.
- Bray, E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Grissem, W., Buchannan, B., Jones, R. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1158-1249.
- Brito, G. G., Sofiatti, V., Lima, M. M. A., Carvalho, L. P., Silva Filho, J. L. (2011). Physiological traits for drought phenotyping in cotton. *Acta Scientiarum Agronomy*, 33:117-125.
- Burow, M. D., Simpson, C. E., Faries, M. W., Starr, J. L., Paterson, A. H. (2009). Molecular biogeographic study of recently described B- and A-genome *Arachis* species, also providing new insights into the origins of cultivated peanut. *Genome*, 52(2):107-119.
- Burow, M. D., Simpson, C. E., 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.
- Burow, M. D., Simpson, C. E., Paterson, A. H., Sattr, J. L. (1996). Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Molecular Breeding*, 2:369-379.
- Burow, M. D., Starr, J. L., Park, C. H., Simpson, C. E., Paterson, A. H. (2014). Introgression of homeologous quantitative trait loci (QTLs) for resistance to the root-knot nematode [*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood] in an advanced backcross-QTL population of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Breeding* 34(2), 393-406.
- Bybd, D. W., Kirkpatrick, T., Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15(1), 142-143.
- Caillaud, M-C; Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., Engler, J. A., Abad, P., Rosso, M-N., Favery, B. (2008). Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Phytopathology* 165(1), 104-113.
- Camoni, L., Visconti, S., Aducci, P., Marra, M. (2018). 14-3-3 proteins in plant hormone signaling: doing several things at once. *Frontier in Plant Science*, 9(297):8.
- Cao, Y., Luo, Q., Tian, Y., Meng, F. (2017). Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots. *BMC Plant Biology*, 17(1):53.
- Carmo, L. S. T., Martins, A. C. Q., Martins, C. C. C., Passos, M. A. S., Silva, L. P., Araujo, A. C. G., Brasileiro, A. C. M., Miller, R. N. G., Guimaraes, P. M., Mehta, A. (2019). Comparative proteomics and gene expression analysis in *Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance. *Journal of Proteomics*, 192:299-310
- Carmo, L. S., Murad, A. M., Resende, R. O., Boiteux, L. S., Ribeiro, S. G., Jorrin-Novo, J. V., Mehta, A. (2017). Plant responses to tomato chlorotic mottle virus: Proteomic view of the resistance mechanisms to a bipartite begomovirus in tomato. *Journal of Proteomics*, 151:284-292.

- Carmo, L. S., Resende, R. O., Silva, L. P., Ribeiro, S. G., Mehta, A. (2013). Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics*, 13:1947-1960.
- Carpentieri-Pípolo, V., Gallo-Meagher, M., Dickson, D. W., Gorbet, D. W., Mendes, M. L., Souza, S. G. H. (2014). Molecular marker screening of peanut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm for *Meloidogyne arenaria* resistance. *African Journal of Biotechnology*, 13(26):2608-2612.
- Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Perfus-Barbeoch, L., Abad, P. (2013). Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: New insights from the genome era. *Annual Review of Phytopathology* 51, 203-220.
- Chalavi, V., Raeini-Sarjaz, M. (2012). The response of transgenic strawberry plants overexpressing a drought induced gene to water stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 85, 182-187.
- Chan, Z. L. (2012). Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis*. *Genomics*, 100(2):110-115.
- Chen, A. P., Zhong, N. Q., Qu, Z. L., Wang, F., Liu, N., Xia, G. X. (2007). Root and vascular tissue-specific expression of glycine-rich protein AtGRP9 and its interaction with AtCAD5, a cinnamyl alcohol dehydrogenase, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 120(2):337-343.
- Chen, J.-Y., Dai, X.-F. (2010). Cloning and characterization of the *Gossypium hirtum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 231(4):861–873.
- Chen, N., Yang, Q., Hu, D., Pan, L., Chi, X., Chen, M., Study, L. Wang, T., Wang, M., He, Y., Yu, S. (2014). Gene expression profiling and identification of resistance genes to low temperature in leaves of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 169:214–225.
- Chen, Q., Guo, W., Feng, L., Ye, X., Xie, W., Huang, X., Liu, J. (2015). Transcriptome and proteome analysis of *Eucalyptus* infected with *Calonectria pseudoreteauidii*. *Journal of Proteomics*, 115:117-131.
- Chen, R. D., Yu, L. X., Greer, A. F., Cheriti, H., Tabaeizadeh, Z. (1994). Isolation of an osmotic stress- and abscisic acid-induced gene encoding an acidic endochitinase from *Lycopersicon chilense*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 245(2):195-202.
- Chen, X., Li, H., Pandey, M. K., Yang, Q., Wang, X., Garg, V., Li, H., Chi, X., Doddamani, D., Hong, Y., Upadhyaya, H., Guo, H., Khan, A. W., Zhu, F., Zhang, X., Pan, L., Pierce, G. J., Zhou, G., Krishnamohan, K. A. V. S., Chen, M., Zhong, N., Agarwal, G., Li, S., Chitkinenic, A., Zhang, G-Q., Sharmac, S., Chend, N., Liua, N., Janilac, P., Lia, S., Wangb, M., Wangd, T., Sund, J., Lia, X., Lib, C., Wangd, M., Yud, L., Wena, S., Singhc, S., Yangd, Z., Zhaob, J., Zhangd, C., Yuh, Y., Bid, J., Zhange, X., Liug, Z-J, Patersonf, A. H., Wangb, S., Lianga, X., Varshneyc, R. K., Yud, S. (2016). Draft genome of the peanut A-genome progenitor (*Arachis duranensis*) provides insights into geocarpy, oil biosynthesis, and allergens. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 113(24):6785-6790.
- Chen, Z., Zhu, D., Wu, J., Cheng, Z., Yan, X., Deng, X., Yan, Y. (2018). Identification of differentially accumulated proteins involved in regulating independent and combined osmosis and cadmium stress response in *Brachypodium* seedling roots. *Scientific Reports*, 8(1):7790.
- Chet, I., Inbar, J. (1997) Fungi. In: Anke T (ed), *Fungal biotechnology*. Chapman & Hall, Weinheim, p. 65-80.
- Chmielewska, K., Rodziewicz, P., Swarcewicz, B., Sawikowska, A., Krajewski, P., Marczak, Ł., Ciesiołka, D., Kuczyńska, A., Mikołajczak, K., Ogródowicz, P., Krystkowiak, K., Surma, M., Adamski, T., Bednarek, P., Stobiecki, M. (2016). Analysis of drought-induced proteomic and metabolomic changes in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and roots unravels some

aspects of biochemical mechanisms involved in drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7:1108.

Cho, H. J., Farrand, S. K., Noel, G. R. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta*. 210(2), 195-204.

Chopra, R., Burow, G., Farmer, A., Mudge, J., Simpson, C. E., Burow, M. D. (2014). Comparisons of De Novo Transcriptome Assemblers in Diploid and Polyploid Species Using Peanut (*Arachis* spp.) RNA-Seq Data. *PLoS One* 9(12), 16 p.

Chu, Y., Deng, X. Y., Faustinelli, P., Ozias-Akins, P. (2008). Bcl-xl transformed peanut (*Arachis hypogaea* L.) exhibits paraquat tolerance. *Plant Cell Reports* 27(1), 85-92.

Chu, Y., Guimarães, L. A., Wu, L., Timper, P., Holbrook, C. C., Ozias-Akins, P. (2014). A technique to study *Meloidogyne arenaria* resistance in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed peanut. *Plant Disease* 98(10), 1292-1299.

Chye, M-L., Zhao, K-J., He, Z-M., Ramalingam, S., Fung, K-L. (2015). An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta*, 220(5):717-730.

Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Fuggi, A., Pontecorvo, G., Carillo, P. (2011). Plant genes for abiotic stress. In: Shanker, A. K., Venkateswarlu, B. (Eds.), *Abiotic in plants – mechanisms and adaptations*. Intech Open Access Publisher, Janeza Trdine, Croatia, pp. 283-308.

Clevenger, J. P., Chu, Y., Scheffler, B., Ozias-Akins, P. (2016). A developmental transcriptome map for allotetraploid *Arachis hypogaea*. *Frontiers in Plant Science* 7(1446), 34 p (Provisional PDF published on 12 Sep 2016).

Clevenger, J., Chu, Y., Guimaraes, L. A., Maia, T., Bertoli, D., Leal-Bertoli, S., Timper, P., Holbrook, C. C., Ozias-Akins, P. (2017). Gene expression profiling describes the genetic regulation of *Meloidogyne arenaria* resistance in *Arachis hypogaea* and reveals a candidate gene for resistance. *Scientific Reports*, 7(1):1317.

Clought, S. J., Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6):735-743.

Conab (2019). *Série Histórica – Amendoim Total (1ª e 2ª Safras)*. Acessado em janeiro de 2019, disponível em Conab – Companhia Nacional de Abastecimento: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/item/download/23900_d2540126764da08769e4bd97fdab5f5b.

Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18):3674-3676.

Curtis, R. H. (2007). Plant parasitic nematode proteins and the host parasite interaction. *Briefings in Functional Genomic & Proteomics*, 6(1):50-58.

Custódio, A. R., Peñalosa, A. P. S., Valls, J. F. M. (2005). Further cytogenetic information on *Arachis stenosperma* (Leguminosae). *Cytologia*, 70(3):331-335.

Danchin, E. G. J., Arguel, M-J., Campan-Fournier, A., Perfus-Barbeoch, L., Magliano, M., Rosso, M-N., Da Rocha, M., Da Silva, C., Nottet, N., Labadie, K., Guy, J., Artiguenave, F., Abad, P. (2013). Identification of novel target genes for safer and more specific control of root-knot nematodes from a pan-genome mining. *PLoS Pathogens*, 9(10), 15 p.

de Dorlodot, S., Forster, B., Pagès, L., Price, A., Tuberosa, R., Draye, X. (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science*, 12(10):474-481.

De Mot, R., Vanderleyden, J. (1989). Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Canadian Journal of Microbiology* 35(10), 960-967.

- Deeba, F., Pandey, A. K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y. K., Shirke, P. A., Pandey, V. (2012). Physiological and proteomic responses of cotton (L.) to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53:6-18.
- Di Silvestre, D., Bergamaschi, A., Bellini, E., Mauri, P. (2018). Large scale proteomic data and network-based systems biology approaches to explore the plant world. *Proteomes*, 6(2):27.
- Dickson, D. W., DeWaele, D. (2005). Nematode parasites of peanut. In: Luc, M., Sikora, R. A., Bridge, J. (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. University of Bonn, Germany, J Bridge, CABI Bioscience, Egham, UK, 393-436.
- Dihn, P. T. Y., Knoblauch, M., Elling, A. A. (2014). Nondestructive imaging of plant-parasitic nematode development and host response to nematode pathogenesis. *Phytopathology*, 104(5), 497-506.
- Dodds, P. N., Rathjen, J. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews. Genetics* 11(8), 539-548.
- Dowd, C., Wilson, I. W., McFadden, H. (2004). Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(6):654-667.
- Dresselhaus, T., Hückelhoven, R. (2018). Biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Agronomy*, 8(11):267.
- Eisenback, J. D., Bernard, E. C., Starr, J. L., Lee, T. A., Tomaszewski, E. K. (2003). *Meloidogyne haplanaria* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peanut in Texas. *Journal of Nematology*, 35(4):395-403.
- Eksi, R., Li, H-D., Menon, R., Wen, Y., Omenn, G. S., Kretzler, M., Guan, Y. (2013). Systematically differentiating functions for alternatively spliced isoforms through integrating RNA-seq Data. *PLoS Computational Biology*, 9(11):e1003314.
- Elling, A. A. (2013). Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology* 103(11), 1092-1102.
- Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., Fenoll, C. (2015). Overview of root-knot nematodes and giant cells. In: Escobar, C., Fenoll, C. *Plant Nematode Interactions A View on Compatible Interrelationships, Series: Advances in Botanical Research* 73, pp. 1-32.
- Escobar, C., Brown, S., Mitchum, M. G. (2011). Transcriptomic and proteomic analysis of the plant response to nematode infection. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (Eds.), *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Science+Business Media B. V., 157-173.
- Fang, X., Chen, J., Dai, L., Ma, H., Zhang, H., Yang, J., Wang, F., Yan, C. (2015). Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. *Proteomics* 15(9), 1525-1543.
- Farooq M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29:185-212.
- Farooq, M., Gogoi, N., Barthakur, S., Baroowa, B., Bharadwaj, N., Alghamdi, S. S., Siddique, K. H. M. (2016). Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(2):81-102.
- Fávero, A. P. (2004). Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando a introgressão de genes de resistência a doenças do amendoim cultivado. *Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil*, 182 p.
- Fávero, A. P. Moraes, S. A., 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., Simpson, C. E., Valls, J. F. M., Velo, N. A. (2006). Study of evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaensis*, *A. duranensis* and *A. hypogaea*. *Crop Science*, 46(4):1546-1552.
- Feng, H., Chen, Q., Feng, J., Zhang, J., Yang, X., Zuo, J. (2007). Functional characterization of the Arabidopsis eukaryotic translation initiation factor 5A-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death. *Plant Physiology*, 144(3):1531-1545.
- Fernández, A., Krapovickas, A. (1994). Cromosomas y evolution en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8(1-4):187-220.
- Ferraz, L. C. C. B., Brown, D. J. F. (2016). *Nematologia de plantas: fundamentos e importância*. Norma Editora, Manaus, Brasil, 251p.
- Ferreira, M. L. F., Casadevall, R., Luciani, M. D., Pezza, A., Casati, P. (2013). New evidence for differential roles of L10 ribosomal proteins from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 163(1):378-391.
- Finotello, F., Camillo, B. (2014). Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. *Briefings in Functional Genomics* 14(2), 130-142.
- Franco, O. L., Pereira, J. L., Costa, P. H. A., Rocha, T. L., Albuquerque, E. V. S., Sá, M. F. G. (2010). *Preparative evaluation 2-DE to study root proteomics during nematode infection in cotton and coffee plants* 40(2), 152-163.
- Fu, Z. Y., Zhang, Z. B., Liu, Z. H., Hu, X. J., Xu, P. (2011). The effects of abiotic stresses on the NADP-dependent malic enzyme in the leaves of the hexaploid wheat. *Biologia Plantarum*, 55(1):196-200.
- Gai, Y. P., Yuan, S. S., Liu, Z. Y., Zhao, H. N., Liu, Q., Qin, R. L., Fang, L. J., Ji, X. L. (2018). Integrated phloem sap mRNA and protein expression analysis reveals phytoplasma-infection responses in Mulberry. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 17(9):1702-1719.
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8(6):469-477.
- Garcia, G. M., Stalker, H. T., Shroeder, E., Kochert, G. (1996). Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome*, 39(5):836-845.
- Garcia-Seco, D., Chiapello, M., Bracale, M., Pesce, C., Bagnaresi, P., Dubois, E., Moulin, L., Vannini, C., Koebnik, R. (2017). Transcriptome and proteome analysis reveal new insight into proximal and distal responses of wheat to foliar infection by *Xanthomonas translucens*. *Scientific Reports*, 7(1):10157.
- Garcia-Seco, D., Zhang, Y., Gutierrez-Mañero, F. J., Martin, C., Ramos-Solano, B. (2015). RNA-Seq analysis and transcriptome assembly for blackberry (*Rubus* sp. Var. Lochness) fruit. *BMC Genomics* 16(5), 14 p.
- Gasmann, W., Appel, H. M., Oliver, M. J. (2016). The interface between abiotic and biotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 67(7):2023-2024.
- Gaussand, G. M. D. J.-M., Jia, Q., Graaff, E. V., Lamers, G. E. M., Fransz, P. F., Hooykaas, P. J. J., de Pater, S. (2011). Programmed cell death in the leaves of the Arabidopsis spontaneous necrotic spots (*sns-D*) mutant correlates with increased expression of the eukaryotic translation initiation factor eIF4B2. *Frontiers in Plant Science*, 2:9.
- Geng, L., Niu, L., Gresshoff, P. M., Shu, C., Song, F., Huang, D., Zhang, J. (2012). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109(3), 491-500.
- Geromanos, S. J., Vissers, J. P., Silva, J. C., Dorschel, C. A., Li, G. Z., Gorenstein, M. V., Bateman, R. H., Langridge, J. I. (2009). The detection, correlation, and comparison of

peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics*, 9(6):1683-1695.

Ghatak, A., Chaturvedi, P., Nagler, M., Roustan, V., Lyon, D., Bachmann, G., Postl, W., Schröfl, A., Desai, N., Varshney, R. K., Weckwerth, W. (2016). Comprehensive tissue-specific proteome analysis of drought stress responses in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (Pearl millet). *Journal of Proteomics*, 143:122-135.

Gheysen, G., Fenoll, C. (2002). Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, 40:191-219.

Gheysen, G., Mitchum, M. G. (2009). Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. In: Berg, R.H. and Taylor, C.G. (Eds.) *Cell biology of plant nematode parasitism: Vol. 15 Plant cell monographs*. Berlin, Heidelberg: SpringerLink, pp. 45-81.

Gheysen, G., Mitchum, M. G. (2019). Phytoparasitic nematode control of plant hormone pathways. *Plant Physiology*, pii: pp.01067.2018.

Ghosh, D., Xu, J. (2014). Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Frontiers in Plant Science*, 5:6.

Ghosh, R., Choi, B., Cho, B.-K., Lim, H.-S., Park, S.-U., Bae, H.-J., Natarajan, S., Bae, H. (2014). Characterization of developmental- and stress-mediated expression of cinnamoyl-coa reductase in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *The Scientific World Journal*, (601845):10.

Ghosh, R., Choi, B., Kim, J., Jeong, M.-J., Mohanta, T. K., Bae, H. (2015). Developmental- and stress-mediated expression analysis of cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) from *Hibiscus cannabinus*. *Journal of Plant Interactions*, 10(1):158-166.

Giles, K., Wildgoose, J. L., Langridge, D. J., Campuzano, I. (2010). A method for direct measurement of ion mobilities using a travelling wave ion guide. *International Journal of Mass Spectrometry* 298 (1-3), 10-16.

Gómez, J., Sánchez-Martínez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomènech, P., Pagès, M. (1988). A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature*, 334:262-264.

Gong, Q., Yang, Z., Wang, X., Butt, H. I., Chen, E., He, S., Zhang, C., Zhang, X., Li, F. (2017). Salicylic acid-related cotton (*Gossypium arboreum*) ribosomal protein GaRPL18 contributes to resistance to *Verticillium dahlia*. *BMC Plant Biology*, 17(1):59.

Goto, D. B., Miyazawa, H., Mar, J. C., Sato, M. (2013). Not to be suppressed? Rethinking the host response at a root-parasite interface. *Plant Science* 213, 9-17.

Goto, D. B., Miyazawa, H., Mar, J. C., Sato, M. (2013). Not to be suppressed? Rethinking the host response at a root-parasite interface', *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 213:9-17.

Grabau, Z. J., Dickson, D. W. (2018). Management of plant-parasitic nematodes in Florida peanut production. IFAS Extension, University of Florida, 10p. Acessado em março de 2019. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN119900.pdf>

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29(7), 644-652.

Gregory, M. P., Gregory, W. C. (1979). Exotic germplasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. *Journal of Heredity* 70(3), 185-193.

Grover, A. (2012). Plant chitinases: Genetic diversity and physiological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31:57-73.

- Guerra, D., Crosatti, C., Khoshro, H. H., Mastrangelo, A. M., Mica, E., Mazzucotelli, E. (2015). 'Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a spider's web of mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 6:14.
- Guimaraes, L. A., Pereira, B. M., Araujo, A. C. G., Guimaraes, P. M., Brasileiro, A. C. M. (2017). *Ex vitro* hairy root induction in detached peanut leaves for plant–nematode interaction studies. *Plant Methods* 13(1), 10 p.
- Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Mehta, A., Araujo, A. C. G. (2017). Functional genomics in peanut wild relatives, *In: Varshney, R.K., Pandey, M. K, Puppala, N. (Ed.) The Peanut Genome Compendium of Plant Genome: SpringerLink*, pp. 149-164.
- Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Morgante, C. V., Martins, A. C. Q., Pappas, G., Silva-Júnior, O. B., Togawa, R., Leal-Bertioli, S. C. M., Araújo, A. C. G., Moretzsohn, M. C., Bertioli, D. J. (2012). Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC Genomics* 13(387), 15 p.
- Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Proite, K., Araújo, A. C. G., Leal-Bertioli, S. C. M., Pic-Taylor, A., Silva, F. R., Morgante, C. V., Ribeiro, S. G., Bertioli, D. J. (2010). A study of gene expression in the nematode resistant wild peanut relative, *Arachis stenosperma*, in response to challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Tropical Plant Biology* 3(4), 183-192.
- Guimarães, P. M., Guimarães, L. A., Morgante, C. V., Silva-Junior, O. B., Araújo, A. C. G., Martins, A. C. M., Saraiva, M. A. P., Oliveira, T. N., Togawa, R. C., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J., Brasileiro, A. C. M. (2015). Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. *PLoS One* 10(10), 22 p.
- Guimarães, P. M., Proite, K., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J. (2005). Análise *in silico* da expressão diferencial de *Arachis stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 85, 25 p.
- Guo, X. L., Bai, L. R., Su, C. Q., Shi, L. R., Wang, D. W. (2013). Molecular cloning and expression of drought-induced protein 3 (DIP3) encoding a class III chitinase in upland rice. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 12(4):6860-6870.
- Guo, Y., Khanal, S. Tang, S., Bowers, J. E., Heesacker, A. F., Khalilian, N., Nagy, E. D., Zhang, D., Taylor, C. A., Stalker, H. T., Ozias-Akins, P., Knapp, S. J. (2012). Comparative mapping in intraspecific populations uncovers a high degree of macrosynteny between A- and B-genome diploid species of peanut. *BMC Genomics*, 13(608):1-12.
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Tran, L. S. P. (2015). Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced
- Haas, B. J., Zody, M. C. (2010). Advancing RNA-Seq analysis. *Nature Biotechnology* 28(5), 421-423.
- Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., Manulis, S. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8):2879-2884.
- Haider, M. S., Zhang, C., Kurjogi, M. M., Pervaiz, T., Zheng, T., Zhang, C., Lide, C., Shangguan, L., Fang, J. (2017). Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological and RNA-Seq analysis. *Scientific Reports*, 7:13134.
- Haider, S., Pal, R. (2013). Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Curr Genomics*, 14(2):91-110.
- Hao, J., Li, W., Dan, J., Ye, X., Wang, F., Zeng, X., Wang, L., Wang, H., Cheng, Y., Liu, L., Shu, W. (2013). Reprogramming- and pluripotency-associated membrane proteins in mouse stem cells revealed by label-free quantitative proteomics. *Journal of Proteomics* 86, 70-84.

- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16(169), 7 p.
- Herrera-Estrella, A., Chet, I. (1999). Chitinases in biological control. *EXS*, 87(1):171-184.
- Holbein, J., Grundler, F. M. W., Siddique, S. (2016). Plant basal resistance to nematodes: an update. *Journal of Experimental Botany* 67(7):2049-2061.
- Holbrook, C. C. (2001). Status of the *Arachis* germplasm collection in the United States. *Peanut Science*, 28(2):84-89.
- Holbrook, C. C., Stalker, H. T. (2003). Peanut breeding and genetic resources, *In*: Janick, J. (Ed.) *Plant Breeding Reviews*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., pp. 297-354.
- Holbrook, C. C., Stephenson, M. G., Johnson, A. W. (2000a). Level and geographical distribution of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the US peanut germplasm collection. *Crop Science*, 40(4):1168-1171.
- Holbrook, C. C., Timper, P., Culbreath, A. K., Kvien, C. K. (2008a). Registration of 'Tifguard' peanut. *Journal of Plant Registrations*, 2(2):92-94.
- Holbrook, C. C., Timper, P., Dong, W. B., Kvien, C. K., Culbreath, A. K. (2008b) Development of near-isogenic peanut lines with and without resistance to the peanut root-knot nematode. *Crop Science* 48(1), 194-198.
- Holbrook, C. C., Timper, P., Xue, H. Q. (2000b). Evaluation of the core collection approach for identifying resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. *Crop Science* 40(4):1172-1175.
- Hong, J. K., Hwang, B. K. (2002). Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum*, 114(4):549-558.
- Hopkins, M. T., Lampi, Y., Wang, T.-W., Liu, Z., Thompson, J. E. (2008). Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148:479-489.
- Hu, B., Cao, J., Ge, K., Li, L. (2016). The site of water stress governs the pattern of ABA synthesis and transport in peanut. *Scientific Reports*, 6:32143.
- Huang, X., Chen, X-G., Armbruster, P. A. (2016). Comparative performance of transcriptome assembly methods for non-model organisms. *BMC Genomics* 17(523), 14 p.
- Huerta-Ocampo, J. A., León-Galván, M. F., Ortega-Cruz, L. B., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Mendoza-Hernández, G., de la Rosa, A. P. (2011). Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biology (Stuttg)*, 13(3):472-482.
- Hussain, S. S., Kayani, M. A., Amjad, M. (2011). Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. *Biotechnology Progress*, 27:297-306.
- Hussey, R. S., Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57(7), 1025-1028.
- Husted, L. (1936). Cytological studies on the peanut *Arachis*. II. Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. *Cytologia International Journal of Cytology* 7(3), 396-423.
- Hütten, M., Geukes, M., Mias-Villamil, J. C., van der Hoorn, R. A., Grundler, F. M., Siddique, S. (2015). Activity profiling reveals changes in the diversity and activity of proteins in Arabidopsis roots in response to nematode infection. *Plant Physiology and Biochemistry* 97, 36-43.

in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathology*, 54(2):93–99.

Ingram, J., Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:377-403.

Iqbal, M. M., Nazir, F., Ali, S., Asif, M. A., Zafar, Y., Iqbal, J., Ali, G. M. (2012). Over expression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot. *Molecular Biotechnology* 50(2): 129-136.

Jacquet, M. Bongiovanni, M. Martinez, M. Verschave, P. Wajnberg, E. Castagnone-Sereno, P. (2005). Variation

Jain, D., Khurana, J. P. (2018). Role pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: Singh, A., Singh, I. K. (Eds.), *Molecular aspects of plant-pathogen interaction*. Springer Nature Singapore, pp. 265-281.

Janiak, A., Kwaśniewski, M., Szarejko, I. (2016). Gene expression regulation in roots under drought. *Journal of Experimental Botany*, 67(4):1003-1014.

Janila, P., Pandey, M. K., Shasidhar, Y., Variath, M. T., Sriswathi, M., Khera, P., Manohar, S. S., Nagesh, P., Vishwakarma, M. K., Mishra, G. P., Radhakrishnan, T., Manivannan, N., Dobariya, K. L., Vasanthi, R. P., Varshney, R. K. (2016). Molecular breeding for introgression of fatty acid desaturase mutant alleles (*ahFAD2A* and *ahFAD2B*) enhances oil quality in high and low oil containing peanut genotypes. *Plant Science*, 242:203-213.

Janila, P., Variath, M. T., Pandey, M. K., Desmae, H., Motagi, B. N., Okori, P., Manohar, S. S., Rathnakumar, A. L., Radhakrishnan, T., Liao, B., Varshney, R. K. (2016). Genomic tools in groundnut breeding program: Status and Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 7(289):1-15.

Jansson, H-B., Tunlid, A., Nordbring-Hertz, B. (1997). Nematodes. In: Anke, T. (ed), *Fungal biotechnology*. Chapman & Hall, Weinheim, p. 38-50.

Jayaraj, J., Punja, Z. K. (2007). Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Reports*, 26(9):1539-1546.

Jeandroz, S., Lamotte, O. (2017). Editorial: Plant responses to biotic and abiotic stresses: lessons from cell signaling. *Frontiers in Plant Science*, 8:1772.

Jiang, L.; Wu, J.; Fan, S.; Li, W.; Dong, L.; Cheng, Q.; Xu, P.; Zhang, S. (2015). Isolation and characterization of a novel pathogenesis-related protein gene (GmPRP) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. *PLoS ONE*, 10(6):e0129932.

Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323-329.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikushi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9), 946-961.

Jones, M. G. K., Goto, D. B. (2011). Root-knot nematodes and giant cells. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (Eds.), *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, pp. 83-100.

Jorrín, J. V., Rubiales, D., Dumas-Gaudot, E., Recorbert, G., A., M., Castillejo, M. A., Curto, M. (2006). Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. A review. *Euphytica*, 147(1-2):37-47.

Jorrín-Novo, J. V., Pascual, J., Sánchez-Lucas, R., Romero-Rodríguez, M. C., Rodríguez-Ortega, M. J., Lenz, C., et al. (2015). Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics* 15(5-6), 1089-1112.

- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Pareek, A., Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7:1029.
- Jungkunz, I., Link, K., Vogel, F., Voll Lars, M., Sonnewald, S., Sonnewald, U. (2011). *AtHsp70-15*-deficient *Arabidopsis* plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV. *The Plant Journal*, 66:983-995.
- Kabir, S. R., Rahman, M. M., Tasnim, S., Karim, M. R., Khatun, N., Hasan, I., Amin, R., Islam, S. S., Nurujjaman, M., Kabir, A. H. (2016). Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84:62-68.
- Kaloshian, I., Desmond, O. J., Atamian, H. S. (2011). Disease resistance-genes and defense responses during incompatible interactions. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C, eds. Genomics and molecular genetics of plant–nematode interactions. Dordrecht, Netherlands: Springer, pp: 309-324.
- Kang, I. H., Gallo, M. (2007). Cloning and characterization of a novel peanut allergen *Ara h 3* isoform displaying potentially decreased allergenicity. *Plant Science*, 172(2):345-353.
- Karssen, G., Wesemael, W., Moens, M. (2013). Root-knot nematodes. In: Perry, R. N., Moens (Eds.), *Plant Nematology, 2nd Edition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 73-108.
- Katam, R., Sakata, K., Suravajhala, P., Pechan, T., Kambiranda, D. M., Naik, K. S., Guo, B., Basha, S. M. (2016). Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and -susceptible peanut in response to water stress. *Journal of Proteomics*, 143:209–226.
- Katam, R., Sakata, K., Suravajhala, P., Pechan, T., Kambiranda, D. M., Naik, K. S., Guo, B., Basha, S. M. (2016). Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and -susceptible peanut in response to water stress. *Journal of Proteomics*, 143:209-226.
- Kesari, P., Patil, D. N., Kumar, P., Tomar, S., Sharma, A. K., Kumar, P. (2015). Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. *Proteomics*, 15(10):1693-1705.
- Khan, A., Nasir, I. A., Tabassum, B., Aaliya, K., Tariq, M., Rao, A. Q. (2017). Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 128(3):563-576.
- Kim, H. S., Yu, Y., Snesrud, E. C., Moy, L. P., Linford, L. D., Haas, B. J. (2005). Transcriptional divergence of the duplicated oxidative stress-responsive genes in the *Arabidopsis* genome. *The Plant Journal*, 41(2):212-220.
- Kim, J-K., Jang, I-C., Wu, R., Zuo, W-N., Boston, R. S., Lee, Y-H., Ahn, I-P., Nahm, B. H. (2003). Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Research*, 12(4): 475-484.
- Kissoudis, C., Van De Wiel, C., Visser, R. G., Van Der Linden, G. (2014). Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 5:207.
- Knauft, D. A., Gorbet, D. W. (1989). Genetic diversity among peanut cultivars. *Crop Science*, 29:1417-1422.
- Kochert, G., Halward, T., Branch, W. D., Simpson, C. E. (1991). RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(5):565-570.
- Kochert, G., Stalker, H. T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C. M., Moore, K. (1996). RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 83(10):1282-1291.

- Koppelman, S. J., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A. C., Knol, E. F. (2004). Relevance of *Ara h1*, *Ara h2* and *Ara h3* in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: *Ara h2* is the most important peanut allergen. *Clinical and Experimental Allergy*, 34(4): 583-590.
- Kosová, K., Vitámvás, P., Prásil, I. T. (2014). Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance. *Frontiers in plant science* 5(711), 14 p.
- Kottapalli, K. R., Payton, P., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Shibato, J., Burow, M., Puppala, N. (2008). Proteomics analysis of mature seed of four peanut cultivars using two-dimensional gel electrophoresis reveals distinct differential expression of storage, anti-nutritional, and allergenic proteins. *The Plant Science*, 175(3):321-329.
- Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Shibato, J., Burow, G., Tissue, D., Burke, J., Puppala, N., Burow, M., Payton, P. (2009). Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell & Environment*, 32(4):380-407.
- Kourelis, J., van der Hoon, R. A. L. (2018). Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell*, 30:285-299.
- Krapovickas, A., Gregory, W. C. (1994). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8(1-4):1-186.
- Kumar, D., Kirti, P. B. (2015a). Pathogen-induced SGT1 of *Arachis diogeni* induces cell death and enhanced disease resistance in tobacco and peanut. *Plant Biotechnology Journal*, 13(1):73-84.
- Kumar, D., Kirti, P. B. (2015b). Transcriptomic and proteomic analyses of resistant host responses in *Arachis diogeni* challenged with late leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis personata*. *PLoS One*, 10(2):1-29.
- Kumar, D., Rampuria, S., Singh, N. K., Shukla, P., Kirti, P. B. (2015). Characterization of a vacuolar processing enzyme expressed in *Arachis diogeni* in resistance response against late leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis personata*. *Plant Molecular Biology*, 88(1-2):177-191.
- Kumar, S., Kanakachari, M., Gurusamy, D., Kumar, K., Narayanasamy, P., Venkata, P. K., Solanke, A., Gamanagatti, S., Hiremath, V., Katageri, I. S., Leelavathi, S., Kumar, P. A., Reddy, V. S. (2016) 'Genome-wide transcriptomic and proteomic analyses of bollworm-infested developing cotton bolls revealed the genes and pathways involved in the insect pest defence mechanism. *Plant Biotechnology Journal*, 14(6):1438-1455.
- 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(2-3):110-119.
- Kwon, Y., Kim, S. H., Jung, M. S., Kim, M. S., Oh, J. E., Ju, H. W., Kim, K.I., Vierling, E., Lee, H., Hong, S. W. (2007). Arabidopsis hot2 encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. *Plant Journal*, 49:184-193.
- Kyndt, T., Nahar, K., Haeck, A., Verbeek, R., Demeestere, K., Gheysen, G. (2017). Interplay between carotenoids, abscisic acid and jasmonate guides the compatible rice-*Meloidogyne graminicola* interaction. *Frontiers in Plant Science*, 8:951.
- Lacorte, C., Romano, E. (2015). Capítulo 3 – Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. In: Brasileiro, A. C. M., Carneiro, V. T. C. (Eds.), *Manual de transformação genética de plantas*. 2ª edição revista e ampliada. Embrapa, Brasília, DF, 64-65.
- Lannoo, N., Van Damme, E. J. M. (2014). Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in Plant Science* 5:397, 16 p.
- Larkunthod, P., Nounjan, N., Siangliw, J. L., Toojinda, T., Sanitchon, J., Jongdee, B., Theerakulpisut, P. (2018). Physiological responses under drought stress of improved

drought-tolerant rice lines and their parents. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2):679-687.

Lavia, G. I. (1998). Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (Section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x=9$. *Cytologia* 63(2), 177-181.

Lavia, G. I., Ortiz, A. M., Fernández, A. (2009). Karyotypic studies in wild germplasm of *Arachis* (Leguminosae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(6):755-764.

Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Tanaka, M., Seki, M., Ham, L. H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L-S. P. (2012). Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 7:e49522.

Leal-Bertioli, S. C. M., 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., Araújo, 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. M., Cavalcante, U., Gouvea, E. G., Ballén-Taborda, C., Shirasawa, K., Guimarães, P. M., Jackson, S. A., Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. C. (2015a). Identification of QTLs for rust resistance in the peanut wild species *Arachis magna* and the development of KASP markers for marker-assisted selection. *G3 – Genes/Genomes/Genetics*, 5(7):1403-1413.

Leal-Bertioli, S. C. M., Farias, M. P., Silva, P. I. T., Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Bertioli, D. J., Araújo, A. C. G. (2010). Ultrastructure of the initial interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with leaves of *Arachis hypogaea* and *Arachis stenosperma*. *Journal of Phytopathology* 158(11-12), 792-796.

Leal-Bertioli, S. C. M., Guedes, L., Guimarães, P. M., Fávero, A. P. Bertioli, D. J. (2005). Isolamento de sequências de *Arachis stenosperma* em resposta à infecção de *Puccinia arachidis* e *Cercosporidium personatum* por cDNA-AFLP. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 94, 16 p.

Leal-Bertioli, S. C. M., José, A. C. V. F., Alves-Freitas, D. M. T., Moretzsohn, M. C., Guimarães, P. M., Nielen, S., Vidigal, B. S., Pereira, R. W., Pike, J., Fávero, A. P., Parniske, M., Varshney, R. K., Bertioli, D. J. (2009). Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *BMC Plant Biology* 9(112), 12 p.

Leal-Bertioli, S. C. M., Moretzsohn, M. C., Roberts, P. A., Ballén-Taborda, C., Borba, T. C. O., Valdisser, P. A., Vianello, R. P., Araújo, A. C. G., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J. (2016). Genetic mapping of resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis stenosperma*: A new source of nematode resistance for Peanut. *G3 – Genes/Genomes/Genetics*, 6(2):377-390.

Leal-Bertioli, S. C. M., Moretzsohn, M. C., Santos, S. P., Brasileiro, A. C. M., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J., Araujo, A. C. G. (2017). 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. M., Santos, S. P., Dantas, K. M., Inglis, P. W., Nielen, S., Araújo, A. C. G., Silva, J. P., Cavalcante, U., Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C. M., Carrasquilha-Garcia, N., Penmetsa, V., Cook, D., Moretzsohn, M. C., Bertioli, D. J. (2015b). *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Annals of Botany*, 115(2):237-249.

Lecoals, A. C., Salesses, G., Minot, J. C., Voisin, R., Bonnet, A., Esmenjaud, D. (1997). Spectrum of the *Ma* genes for resistance to *Meloidogyne* spp. In Myrobalan plum. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(8):1325-1334.

Lei, Z., Dai, X., Watson, B. S., Zhao, P. X., Sumner, L. W. (2011). A legume specific protein database (LegProt) improves the number of identified peptides, confidence scores and

overall protein identification success rates for legume proteomics. *Phytochemistry*, 72(10):1020-1027.

Leng, G., Hall, J. (2019). Crop yield sensitivity of global major agricultural countries to droughts and the projected changes in the future. *Science of the Total Environment*, 654:811-821

Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J. M., Barroso, J. B., Corpas, F. J. (2011). Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6):789-793.

Levin, Y., Hradetzky, E., Bahn, S. (2011). Quantification of proteins using data-independent analysis (MSE) in simple and complex samples: a systematic evaluation. *Proteomics* 11(16), 3273-3287.

Li, G. Z., Vissers, J. P., Silva, J. P., Golick, D., Gorenstein, M. V., Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* 9(6), 1696-1719.

Li, H. F., Zhu, F. H., Li, H. Y., Zhu, W., Chen, X. P., Hong, Y. B., Liu, H. Y., Wu, H., Liang, X. Q. (2013). Proteomic identification of gravitropic response genes in peanut gynophores. *Journal of Proteomics*, 93:303-313.

Li, P., Zhang, Y., Wu, X., Liu, Y. (2018). Drought stress impact on leaf proteome variations of faba bean (*Vicia faba* L.) in the Qinghai–Tibet Plateau of China. *3 Biotech*, 8(2):110.

Li, Z., Jarret, R. L., Demski, J. W. (1997). Engineered resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic peanut expressing the viral nucleocapsid gene. *Transgenic Research* 6(4), 297-305.

Liao, L., McClatchy, D. B., Yates, J. R. (2009). Primer: Shotgun proteomics in neuroscience. *Neuron* 63(1), 12-26.

Liu, D. W., Chen, L. J., Duan, Y. X. (2011). Differential proteomic analysis of the resistant soybean infected by soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Race 3. *Journal of Agricultural Science* 3(4), 160-167.

Liu, H., Li, H., Gu, J., Deng, L., Ren, L., Hong, Y., Lu, Q., Chen, X., Liang, X. (2018). Identification of the candidate proteins related to oleic acid accumulation during peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed development through comparative proteome analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4):1235.

Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A. K. M. (2006). The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(1-3):3-13.

Liu, S., Su, L., Liu, S., Zeng, X., Zheng, D., Hong, L., Li, L. (2016). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Arachis hypogaea*: an efficient tool for functional study of genes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30(5), 10 p.

Liu, Y., Beyer, A., Aebersold, R. (2016). On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, 165(3):535-550.

Liu, Z., Qin, J., Tian, X., Xu, S., Wang, Y., Li, H., Wang, X., Peng, H., Yao, Y., Hu, Z., Ni, Z., Xin, M., Sun, Q. (2018). Global profiling of alternative splicing landscape responsive to drought, heat and their combination in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 16(3):714-726.

Lohse, M., Nagel, A., Herter, T., May, P., Schroda, M., Zrenner, R., Tohge, T., Fernie, A. R., Stitt, M., Usadel, B. (2014). Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data', *Plant, Cell & Environment*, 37(5):1250-1258.

Love, M., Anders, S., Huber, W. (2013). 'Differential analysis of RNA-Seq data at the gene level using the DESeq package'.

- Lu, B., Motoyama, A., Ruse, C., Venable, J., Yates, J. R. 3rd. (2008). Improving protein identification sensitivity by combining MS and MS/MS information for shotgun proteomics using LTQ-Orbitrap high mass accuracy data. *Analytical Chemistry* 80, 2018–2025.
- Lu, B., Zeng, Z., Shi, T. (2013). Comparative study of *de novo* assembly and genome-guided assembly strategies for transcriptome reconstruction based on RNA-seq. *Science China. Life Sciences* 56(2), 143-155.
- Ludwig, A., Romeis, T., Jones, J. D. (2004). CDPK mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*, 55:181-188.
- 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.
- Luo, X., Xu, N., Huang, J., Gao, F., Zou, H., Boudsocq, M., Coaker, G., Liu, J. (2017). A lectin receptor-like kinase mediates pattern-triggered salicylic acid signaling', *Plant Physiology*, 174:2501–2514.
- Lytle, B. L., Song, J., de la Cruz, N. B., Peterson, F. C., Johnson, K. A., Bingman, C. A., Phillips, G. N. Jr., Volkman, B. F. (2009). Structures of two *Arabidopsis thaliana* Major Latex Proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins*, 76(1):237-243.
- Maier, T., Guell, M., Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*, 583(24):3966-3973.
- Maleck, K., Dietrich, R. A. (1999). Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science*, 4(6):215-219
- Malik, S., Upadhyaya, K. C., Khurana, S. M. P. (2017). Phylogenetic analysis of nuclear-encoded RNA maturases. *Evolutionary Bioinformatics*, 13:1176934317710945.
- Malsam, O., Kilian, M., Hain, R., Berg, D. (1997). Fungal insecticides. In: Anke, T. (ed), *Fungal biotechnology*. Chapman & Hall, Weinheim, p. 27-37.
- Malter, D., Wolf, S. (2011). Melon phloem-sap proteome: developmental control and response to viral infection. *Protoplasma*, 248(1):217-224.
- Mangeon, A., Junqueira, R. M., Sachetto-Martins, G. (2015). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signaling & Behavior*, 5(2):99-104.
- Manosalva, P., Manohar, M., von Reuss, S. H., Chen, S., Koch, A., Kaplan, F., Choe, A., Micikas, R. J., Wang, X., Kogel, K. H., Sternberg, P. W., Williamson, V. M., Schroeder, F. C., Klessig, D. F. (2015). Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications*, 6:7795.
- Martin, J. A., Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews. Genetics*, 12(10):671-682.
- Mendy, B., Wang'ombe, M. W., Radakovic, Z. S., Holbein, J., Ilyas, M., Chopra, D., Holton, N., Zipfel, C., Grundler, F. M., Siddique, S. (2017). Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinase NLR1 is required for induction of innate immunity to parasitic nematodes. *PLoS Pathogens*, 13(4):e1006284.
- Mercer, C. F., Greenwood, D. R., Grant, J. L. (1992). Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood (Nematoda: Tylenchida). *Nematologica*, 38:227-236.
- Merchant, C., Stepanova, A. N., Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *The Plant Journal*, 90:628-653.
- Michelmore, R. W. (2003). The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6(4), 397-404.

- Michelotto, M. D., Barioni Júnior, W., Resende, M. D. V., Godoy, I. J., Leonardecz, E., Fávero, A. P. (2015). Identification of fungus resistant wild accessions and interspecific hybrids of genus *Arachis*. *PLoS One*, 19(10):1-17.
- Miller, R. N. G., Alves, G. S. C., Sluys, M-A. V. (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany*, 119(5):681-687.
- Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Baum, T. J., Wang, X. H., Elling, A. A., Wubben, M., Davis, E. L. (2013). Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist* 199(4), 879-894.
- Mittler, R., Blumwald, E. (2015). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *The Plant Cell*, 27(1):64-70.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6):300-309
- Moin, M., Bakshi, A., Saha, A., Dutta, M., Madhav, S. M., Kirti, P. B. (2016). Rice ribosomal protein large subunit genes and their spatio-temporal and stress regulation', *Frontiers in Plant Science*, 7(1284):20.
- Molina, C., Rotter, B., Horres, R., Udupa, S. M., Besser, B., Bellarmino, L., Baum, M., Matsumura, H., Terauchi, R., Kahl, G., Winter, P. (2008). SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics*, 9:553.
- Monaghan, J., Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* 15(4), 349-357.
- Moosavi, M. R. (2017). The effect of gibberellin and abscisic acid on plant defense responses and on disease severity caused by *Meloidogyne javanica* on tomato plants. *J Gen Plant Pathol*, 83(3):173-184.
- Moraes, S. A., Salgado, C. L. (1982). Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) para inoculações com *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercosporidium personatum* (Bert. & Curt.) Ell & Ev. *Summa Phytopathologica* 8, pp. 39-55.
- Moretzsohn, M. C., Gouvea, E. G., Inglis, P. W., Leal-Bertioli, S. C. M., Valls, J. F. M., 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.
- Moretzsohn, M. C., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Kresovich, S., Valls, J. F. M., Ferreira, M. E. (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, 4(11):1-10 p.
- Moretzsohn, M. C., Leoi, L., Proite, K., Guimarães, P. M., Leal-Bertioli, S. C. M., Gimenes, M. C., Martins, W. S., Valls, J. F. M., Grattapaglia, D., 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.
- Morgante, C. V., Brasileiro, A. C. M., Roberts, P. A., Guimaraes, L. A., Araujo, A. C. G., Fonseca, L. N., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J., Guimaraes, P. M. (2013). A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Functional Plant Biology* 40, 1298-1309.
- Morgante, C. V., Guimarães, P. M., Martins, A. C. Q., Araujo, A. C. G., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J., Brasileiro, A. C. M. (2011). Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. *BMC Research Notes* 4(339), 11 p.
- Mousavi, S. A., Pouya, F. M., Ghaffari, M. R., Mirzaei, M., Ghaffari, A., Alikhani, M., Ghareyazie, M., Komatsu, S., Haynes, P. A., Salekdeh, G. H. (2016). PlantPReS: A database for plant proteome response to stress. *Journal of Proteomics* 143, 69-72.

- Muchow, R. C., Sinclair, T. R. (1991). Water deficit effects on maize yields modeled under current and "greenhouse" climates. *Agronomy Journal*, 83:1052-1059.
- Mupunga, I., Mngqawa, P., Katerere, D. R. (2017). Peanuts, aflatoxins and undernutrition in children in Sub-Saharan Africa. *Nutrients*, 9(12):1287.
- Murad, A. M., Souza, G. H. M. F., Garcia, J. S., Rech, E. L. (2011). Detection and expression of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS^E. *Journal Separation Science* 34(19), 2618-2630.
- Nagaraj, S., Senthil-Kumar, M., Ramu, V. S., Wang, K., Mysore, K. S. (2016). Plant ribosomal proteins, RPL12 and RPL19, play a role in nonhost disease resistance against bacterial pathogens. *Frontier in Plant Science*, 6:1192.
- Nagy, E. D., Chu, Y., Guo, Y., Khanal, S., S., T., Li, Y., Dong, W. B., Timper, P., Taylor, C., Ozias-Akins, P., Holbrook, C. C., Beilinson, V., Nielsen, N. C., Stalker, H. T., Knapp, S. J. (2010). Recombination is suppressed in an alien introgression in peanut harboring Rma, a dominant root-knot nematode resistance gene. *Molecular Breeding*, 26(2):357-370.
- Nahar, K., Kyndt, T., De Vleeschauwer, D., Höfte, M., Gheysen, G. (2011). The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiology*, 157(1):305-316.
- 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*, 158(1):43-57.
- Nelson, S. C., Simpson, C. E., Starr, J. L. (1989). Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp. germplasm. *The Journal of Nematology* 21(4S), 654-660.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtpong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M., Nielsen, J. (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 40(20), 10084-10097.
- Nwokolo E. (1996). Peanut (*Arachis hypogaea* L.). In: Smartt, J., Nwokolo, E. (Eds.), *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*. Chapman and Hall, New York, USA, pp. 49-63.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry* 250(10), 4007-4021.
- Osmark, P., Boyle, B., Brisson, N. (1998). Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. *Plant Molecular Biology*, 38:1243-1246.
- 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.
- Pandey, M. K., Monyo, E., Ozias-Akins, P., Liang, X., Guimaraes, P., Nigam, S. N., Upadhyaya, H. D., Janila, P., Zhang, X., Guo, B., Cook, D. R., Bertioli, D. J., Michelmore, R., Varshney, R. K. (2012). Advances in *Arachis* genomics for peanut improvement. *Biotechnology Advances*, 30(3):639-651.
- Park, C. J., Seo, Y. S. (2015). Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. *The Plant Pathology Journal*, 31(4):323-333.
- Patel, S. S., Shah, D. B., Panchal H. J. (2015). De Novo Transcriptome Analysis of *Arachis hypogaea* L. (SRR1212866). *OMICS Research* 5(1), 6 p.
- Pavlović, I., Petřík, I., Tarkowská, D., Lepeduš, H., Vujčić Bok, V., Radić Brkanac, S., Novák, O., Salopek-Sondi, B. (2018). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10): pii: E2866.
- Peñaloza, A. P. S., Valls, J. F. M. (2005). Chromosome number and satellited chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 14(1-2), 65-72.

- Peng, H., Kaloshian, I. (2014). The tomato leucine-rich repeat receptor-like kinases SISERK3A and SISERK3B have overlapping functions in bacterial and nematode innate immunity. *PLoS One*, 9(3):e93302.
- Petritz, B. A., Almeida, J. A., Gomes, C. P. C., Pereira, R. W., Murad, A. M., Franco, O. L. (2015). NanoUPLC/MSE proteomic analysis reveals modulation on left ventricle proteome from hypertensive rats after exercise training. *Journal of Proteomics*, 113:351-365.
- 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), 10 p.
- photoinhibition. *Molecular Plant*, 8(9):1304-1320.
- Poersch-Bortolon, L. B., Pereira, J. F., Nhani, A., Gonzáles, H. H. S., Torres, G. A. M., Consoli, L., Arenhart, R. A., Bodanese-Zanettini, M. H., Margis-Pinheiro, M. (2016). Gene expression analysis reveals important pathways for drought response in leaves and roots of a wheat cultivar adapted to rainfed cropping in the Cerrado biome. *Genetics and Molecular Biology*, 39(4):629-645.
- Prabhudas, S. K., Prayaga, S., Madasamy, P., Natarajan, P. (2016). Shallow Whole Genome Sequencing for the Assembly of Complete Chloroplast Genome Sequence of *Arachis hypogaea* L.. *Frontiers in Plant Science* 7(1106), 3 p.
- Prasad, K., Bhatnagar-Mathur, P., Waliyar, F., Sharma, K. K. (2013). Overexpression of a chitinase gene in transgenic peanut confers enhanced resistance to major soil borne and foliar fungal pathogens. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(2):222-233.
- Prince, A. M., Khan, F. H., Matthews, B. F., Islam, N., Natarajan, S. S. (2014). Transcriptome and proteome alterations during the nematode-soybean interaction. *Nematropica*, 44(2):137-145.
- Proite, K., Carneiro, R. M. D. G., Falcão, R., Gomes, A. C. M. M, Leal-Bertioli, S. C. M., Guimarães, P. M., Bertioli, D. J. (2008). Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, 57(5):974-980.
- Proite, K., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. C., Silva, F. R., Martins, N. F., Guimarães, P. M. (2007). ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology* 7(7), 10 p.
- Que, W., Huang, N., Liu, F., Xiao, X., Ling, H., Zhang, Y., Su, W., Su, Y., Wu, Q., Que, Y. (2015). Isolation and expression of a eukaryotic translation initiation factor 5A gene from sugarcane. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 21(6):1120-1127.
- Raeini Sarjaz, M., Chalavi, V. (2011). Effects of water stress and constitutive expression of a drought induced chitinase gene on water-use efficiency and carbon isotope composition of strawberry. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84(1):90-94
- Rao, N. K., Reddy, L. J., Bramel, P. J. (2003). Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(7):707-721.
- Rao, T. S. R. B., Naresh, J. V., Reddy, P. S., Reddy, M. K., Mallikarjuna, G. (2017). Expression of *Pennisetum glaucum* eukaryotic translational initiation factor 4A (PgeIF4A) confers improved drought, salinity, and oxidative stress tolerance in groundnut. *Frontiers in Plant Science*, 8:453.
- Rathi, D., Gayen, D., Gayali, S., Chakraborty, S., Chakraborty, N. (2016). Legume proteomics: Progress, prospects, and challenges. *Proteomics*, 16(2):310-327.
- Rawat, S., Ali, S., Mitra, B., Grover, A. (2017). Expression analysis of chitinase upon challenge inoculation to *Alternaria* wounding and defense inducers in *Brassica juncea*. *Biotechnology Reports*, 13:72-79.
- Rehman, H. M., Nawaz, M. A., Shah, Z. H., Ludwig-Müller, J., Chung, G., Ahmad, M. Q., Yang, S. H., Lee, S. I. (2018). Comparative genomic and transcriptomic analyses of Family-

- 1 UDP glycosyltransferase in three *Brassica* species and *Arabidopsis* indicates stress-responsive regulation. *Science Reports*, 8:1875.
- Ren, B., Chen, Q., Hong, S., Zhao, W., Feng, J., Feng, H., Zuo, J. (2013). The *Arabidopsis* eukaryotic translation initiation factor eIF5A-2 regulates root protoxylem development by modulating cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 25(10):3841-3857.
- Resing, K. A., Ahn, N. G. (2005). Proteomics strategies for protein identification. *FEBS letters* 579(4), 885-889.
- Rhaman, L. (2003). Root Knot Nematodes and its control. *Agfacts* AB.1, 3th edition. New Agriculture, The State of New South Wales, p. 10.
- Richa, K., Tiwari, I. M., Kumari, M., Devanna, B. N., Sonah, H., Kumari, A., Nagar, R., Sharma, V., Botella, J. R., Sharma, T. R. (2016). Functional characterization of novel chitinase genes present in the sheath blight resistance QTL: qSBR11-1 in rice line Tetep. *Frontiers in Plant Science*, 7:244.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1), 139-140.
- Robledo, G., Seijo, G. (2008). Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. *Genetics and Molecular Biology* 31(3), 717-724.
- Robledo, G., Seijo, G. (2010). Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based in FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics* 121(6), 1033-1046.
- Rohini, V. K., Sankara, R. K. (2001). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Science*, 160(5):889-898.
- Rupert, B., Bonghi, C., Ziliotto, F., Pagni, S., Rasori, A., Varotto, S., Tonutti, P., Giovannoni, J. J., Ramina, A. (2002). Characterization of a major latex protein (MLP) gene down-regulated by ethylene during peach fruitlet abscission. *Plant Science*, 163(2):265-272.
- Santana, S. H., Valls, J. F. M. (2015). *Arachis veigae* (Fabaceae), the most dispersed wild species of the genus, and yet taxonomically overlooked. *Bonplandia*, 22(2):139-150.
- Sarwat, M., Tuteja, N. (2017). Hormonal signaling to control stomatal movement during drought stress. *Plant Gene*, 11(part B):143-153.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS*, 97(21):11655-11660.
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Latendorf, T., Nebendahl, M., Petersen, A., Krause, S., Leippe, M., Becker, W. M., Janssen, O. (2009). 2-D DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents. *Proteomics*, 9(13):3507-3521.
- Schmitz-Linneweber, C., Lampe, M. K., Sultan, L. D., Ostersetzer-Biran, O. (2015). Organellar maturases: A window into the evolution of the spliceosome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(9):798-808.
- Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D., Moscone, E. A. (2004). Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaënsis* are the wild diploid progenitors of the *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 91(9):1294-1303.
- Seijo, J. G., Lavia, G. I., Fernández, 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. *American Journal of Botany*, 94(12):1963-1971.

Shah, J. M., Singh, R., Veluthambi, K. (2012). Transgenic rice lines constitutively co-expressing *tlp-D34* and *chi11* display enhancement of sheath blight resistance. *Biologia Plantarum*, 57(2):351-358.

Shakeel, S. N., Aman, S., Haq, N. U., Keckathorn, S. A., Luthe, D. (2013). Proteomic and transcriptomic analyses of *Agave americana* in response to heat stress. *Plant Molecular Biology Report*, 31(4):840-851.

Sharma, K. K., Bhatnagar-Mathur, P. (2006). Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Methods in Molecular Biology*, 343:347-358.

Sharma, K. K., Lavanya, M. (2002). Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. *JIRCAS Working Reports*, 23:61-73

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.

Sheshshayee, M. S., Bindumadhava, H., Rachaputi, N. R., Prasad, T. G., Udayakumar, M., Wright, G. C., Nigam, S. N. (2006). Leaf chlorophyll concentration relates to transpiration efficiency in peanut. *Annals of Applied Biology*, 148:7-15.

Shi, H., Liu, W., Yao, Y., Wei, Y., Chan, Z. (2017). Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) confers both abiotic and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 262:24-31.

Shirasawa, K., Bertoli, D. J., Varshney, R. K., Moretzsohn, M. C., Leal-Bertoli, S. C. M., Thudi, M., Pandey, M. K., Rami, J-F., Foncéka, D., Gowda, V. C., Qin, H., Guo, B., Hong, Y., Liang, X., Hirakawa, H., Tabata, S., Isobe, S. (2013). Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legumes genomes. *DNA Research*, 20(2):173-184.

Silva, J. C., Denny, R., Dorschel, C., Gorenstein, M. V., Li, G. Z., Richardson, K., Wall, D., Geromanos, S. J. (2006). Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(4):589-607.

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*. *Peanut Science*, 18(1):22-26.

Simpson, C. E., Starr, J. L. (2001) Registration of 'COAN' peanut. *Crop Science* 41(3), 918.

Simpson, C. E., Starr, J. L., Church, G. T., Burow, M. D., Paterson, A. H. (2003). Registration of 'NemaTAM' peanut. *Crop Science* 43(4), 1561.

Simpson, G. M. (1981). The value of physiological knowledge of water stress in plants. In: Simpson, G. M. (ed), *Water Stress on Plants*. Praeger, New York, p. 235-265.

Singh, A. K., Moss, J. P. (1982). Utilization of wild relatives in genetics improvement of *Arachis hypogaea* L.: Part 2: chromosome complements of species in section *Arachis*. *Theoretical and Applied Genetics* 61(4), 305-314.

Singh, A. K., Moss, J. P. (1984). Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L.: 5. Genome analysis in section *Arachis* and its implications in gene transfer. *Theoretical and Applied Genetics*, 68(4):355-364.

Singh, A. K., Simpson, C. E. (1994). Biosystematics and genetic resources. In: Smartt, J. (Ed.). *The groundnut crop: A scientific basis for improvement*. Chapman e Hall, London, UK, pp. 96-137.

- Singh, A. K., Smartt, J., Singh, R. (2004). Variation studies in a wild groundnut species, *Arachis stenosperma* Krapov. & W. C. Gregory nov. sp. *Plant Genetic Resources* 2(2), 99-106.
- Singh, B., Singh, U. (1991). Peanut as a source of protein for human foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 41(2): 165-177.
- Sinharoy, S., Saha, S., Chaudhury, S. R., DasGupta, M. (2009). Transformed hairy roots of *Arachis hypogaea*: A tool for studying root nodule symbiosis in a non-infection thread legume of the Aeschynomeneae tribe. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(2), 132-142.
- Smartt, J., Gregory, W. C., Gregory, M. P. (1978). The genome of *Arachis hypogaea* L. Cytogenetic studies of putative genome donors. *Euphytica* 27, 665-675.
- Smith, B. W. (1950). *Arachis hypogaea*. Aerial flower and subterranean fruit. *American Journal Botany*, 37(10):802-815.
- Snel, B., Lehmann, G., Bork, P., Huynen, M. A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Research*, 28(18):3442-3444.
- Spoel, S. H., Loake, G. J. (2011). Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4):358-364.
- Sridevi, G., Parameswari, C., Sabapathi, N., Raghupathy, V., Veluthambi, K. (2008). Combined expression of chitinase and β 1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. *Plant Science*, 175(3):283-290.
- Stalker, H. T. (1991). A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. *American Journal of Botany* 78(5), 630-637.
- Stalker, H. T. (2017). Utilizing wild species for peanut improvement. *Crop Science*, 57:1102-1120.
- Stalker, H. T., Dalmacio, R. D. (1981). Chromosomes of *Arachis* species, section *Arachis*. *The Journal of Heredity*, 72(6):403-408.
- Stalker, H. T., Moss, J. P. (1987). Speciation, cytogenetics, and utilization of *Arachis* species. *Advances in Agronomy*, 41:1-40.
- Stalker, H. T., Tallury, S. P., Ozias-Akins, P., Bertoli, D. J., Leal-Bertoli, S. C. M. (2013). The value of diploid peanut relatives for breeding and genomics. *Peanut Science*, 40(2):70-80.
- Stalker, H. T., Tallury, S. P., Seijo, G. R., Leal-Bertoli, S. C. (2016). Biology, speciation, and utilization of peanuts species. In: Stalker, H. T., Wilson, R. F. (Eds.), *Peanuts: Genetics, Processing, and Utilization*. Academic Press and AOCS Press, USA, pp. 27-66.
- Stare, T., Stare, K., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Gruden, K. (2017). Comparison between proteome and transcriptome response in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves following *Potato Virus Y* (PVY) infection. *Proteomes*, 5(3).
- Starr, J. L., Morgan, E. R., Simpson, C. E. (2002). Management of the peanut root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*, with host resistance. *Plant Health Progress*. Acessado em setembro de 2016, disponível em PMN – Plant Management Network International: <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/management/rootknot/>
- Stastna, M., Van Eyk, J. E. (2012). Analysis of protein isoforms: can we do it better? *Proteomics*, 12(19-20):2937-2948.
- Su, Y., Xu, L., Wang, S., Wang, Z., Yang, Y., Chen, Y., Que, Y. Identification, phylogeny, and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Scientific Reports*, 5:10708.
- Subrahmanyam, P., Naidu, R. A., 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.

- Sun, Y., Wang, Q., Li, Z., Hou, L., Dai, S., Liu, W. (2013). Comparative proteomics of peanut gynophore development under dark and mechanical stimulation. *Journal of Proteome Research*, 12(12):5502-5511.
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H. A., Shulaev, E., Cortes, D. F., Shuman, J. L., Luo, X., Shah, J., Schlauch, K., Shulaev, V., Mittler, R. (2013). Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *The Plant Cell*, 25(9):3553-3569.
- Swarupa, V., Pavitra, K., Shivashankara, K. S., Ravishankar, K. V. (2016). Omics-driven approaches in plant–microbe interaction. In: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. pp. 61-84.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J., von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45:D362-368.
- Teixeira, M. A., Wei, L. H., Kaloshian, I. (2016). Root-knot nematodes induce pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* roots. *The New Phytologist*, 211(1): 276–287.
- Thangella, P. A. V., Pasumarti, S. N. B. S., Pullakhandam, R., Geereddy, B. R., Daggi, M. R. (2018). Differential expression of leaf proteins in four cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under water stress. *3 Biotech*, 8(3):157.
- Thies, J. A., Fery, R. L., (2000). Characterization of resistance conferred by the *N* gene to *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2, *M. hapla*, and *M. javanica* in two sets of isogenic lines of *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1):71–75.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P., Selbig, J., Muller, L. A., Rhee, S. Y., Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 37(6):914-939.
- Tirumalaraju, S. V., Jain, M., Gallo, M. (2011). Differential gene expression in roots of nematode-resistant and -susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization. *Journal of Plant Physiology*, 168(5):481-492.
- Tiwari, S., Mishra, D. K., Singh, A., Singh, P. K., Tuli, R. (2008). Expression of a synthetic *cry1EC* gene for resistance against *Spodoptera litura* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports* 27(6), 1017-1025.
- Toomer, O. T. (2017). Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea*). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 1-12.
- Toufiq, N., Tabassum, B., Bhatti, M. U., Khan, A., Tariq, M., Shahid, N., Nasir, I. A., Husnain, T. (2017). Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2):414-421.
- Trudgill, D. L., Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39, 53-77.
- Tuteja, N., Banu, M. S., Huda, K. M., Gill, S. S., Jain, P., Pham, X. H., Tuteja, R. (2014). Pea p68, a DEAD-box helicase, provides salinity stress tolerance in transgenic tobacco by reducing oxidative stress and improving photosynthesis machinery. *PLoS One*, 9(5):e98287.
- Tuteja, N., Sopory, S.K. (2008). Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 3(8):525-536.

- Upadhyaya, H. D., Ferguson, M. E., Bramel, P. J. (2001). Status of the *Arachis* germplasm collection at ICRISAT. *Peanut Science*, 28:89-96.
- USDA-FAS (2018a). *Oilseeds: World Markets and Trade*. Acessado em janeiro de 2019, disponível em USDA – United States Department of Agriculture/FAS – Foreign Agricultural Service: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>.
- USDA-FAS (2018b). Table 13 – *Peanut Area, Yield, and Production*. Acessado em janeiro de 2019, disponível em USDA – United States Department of Agriculture/FAS – Foreign Agricultural Service: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>.
- Valliyodan, B., Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:189-195.
- Valls, J. F. M., Costa, L. C., Custodio, A. R. (2013). A novel trifoliote species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section trierectoides. *Bonplandia*, 22(1):91-97.
- Valls, J. F. M., Simpson, C. E. (2005). New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay, and Bolivia. *Bonplandia*, 14(1-2):35-63.
- Varshney, R. K., Tuberosa, R., Tardieu, F. (2018). Progress in understanding drought tolerance: from alleles to cropping systems. *Journal of Experimental Botany*, 69(13):3175–3179.
- Vega, D., Newton, A. C., Sadanandom, A. (2018). Post-translational modifications in priming the plant immune system: ripe for exploitation? *FEBS Press*, 592(12):1929-1936.
- Veiga, R. F., Queiroz-Voltan, R. B., Valls, J. F. M., Fávero, A. P., Barbosa, W. (2001). Caracterização morfológica de acessos de germoplasma de quatro espécies brasileiras de amendoim-silvestre. *Bragantia* 60(3), 167-176.
- Vella, D., Zoppis, I., Mauri, G., Mauri, P., Di Silvestre, D. (2017). From protein-protein interactions to protein co-expression networks: a new perspective to evaluate large-scale proteomic data. *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology*, 1:6.
- Vierstra, R. D. (2012). The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiology*, 160(1):2-14.
- Villeth, G. R., Carmo, L. S., Silva, L. P., Fontes, W., Grynberg, P., Saraiva, M., Brasileiro, A. C., Carneiro, R. M., Oliveira, J. T., Grossi-de-Sa, M. F., Mehta, A. (2015). Cowpea-*Meloidogyne incognita* interaction: Root proteomic analysis during early stages of nematode infection. *Proteomics*, 15(10):1746-1759.
- Vinson, C. C., Mota, A. P. Z., Oliveira, T. N., Guimaraes, L. A., Leal-Bertioli, S. C. M., Williams, T. C. R., Nepomuceno, A. L., Saraiva, M. A. P., Araujo, A. C. G., Guimaraes, P. M., Brasileiro, A. C. M. (2018). Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. *PLoS ONE*, 13(5): e0198191.
- Viquez, O. M., Konan, K. N., Dodo, H. W. (2003). Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, *Ara h 1*. *Molecular Immunology*, 40(9):565-571.
- Vogel, C., Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews. Genetics*, 13(4):227-232.
- Voll, L. M., Zell, M. B., Engelsdorf, T., Saur, A., Wheeler, M. G., Drincovich, M. F., Weber, A. P., Maurino, V. G. (2012). Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. *The New Phytologist*, 195(1):189-202.
- von Me Chen, X., Li, H., Pandey, M. K., Yang, Q., Wang, X., Garg, V., Li, H., Chi, X., Doddamani, D., Hong, Y., Upadhyaya, H., Guo, H., Khan, A. W., Zhu, F., Zhang, X., Pan, L., Pierce, G. J., Zhou, G., Krishnamohan, K. A. V. S., Chen, M., Zhong, N., Agarwal, G., Li, S., Chitikinetic, A., Zhang, G-Q., Sharmac, S., Chend, N., Liua, N., Janilac, P., Lia, S., Wangb, M., Wangd, T., Sund, J., Lia, X., Lib, C., Wangd, M., Yud, L., Wena, S., Singhc, S., Yangd, Z., Zhaob, J., Zhangd, C., Yuh, Y., Bid, J., Zhange, X., Liug, Z-J, Patersonf, A. H.,

- Wang, S., Liang, X., Varshney, R. K., Yund, S. (2016). Draft genome of the peanut A-genome progenitor (*Arachis duranensis*) provides insights into geocarpy, oil biosynthesis, and allergens. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 113(24):6785-6790.
- N. (1997). Invasion and migration behavior of sedentary nematodes. In: Fenoll, C., Grundler, F. M. W., Ohi, S. (Eds), *A Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions. Series: Development in Plant Pathology* 10. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 51-64.
- von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P. and Snel, B. (2003) 'STRING: a database of predicted functional associations between proteins', *Nucleic Acids Research*, 31(1), pp. 258-261.
- Wang, F. X., Ma, Y. P., Yang, C. L., Zhao, P. M., Yao, Y., Jian, G. L., Luo, Y. M., Xia, G. X. (2011). Proteomic analysis of the sea-island cotton roots infected by wilt pathogen *Verticillium dahlia*. *Proteomics*, 11(22):4296-4309.
- Wang, H., Guo, X., Pandey, M. K., Ji, X., Varshney, R. K., Nwosu, V., Guo, B. (2017). History and Impact of the International Peanut Genome Initiative: The Exciting Journey Toward Peanut Whole-Genome Sequencing. In: Varshney RK, Pandey MK, Puppala N, editors. *The Peanut Genome*. Cham: Springer International Publishing, p. 117-133.
- Wang, L., Huang, G-Q., Sun, Y., Li, Y., Yao, W-J., Jiang, T-B. (2016a). Cloning and expression analysis of eIF-5A gene in *Apocynum venetum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(4):677-684.
- Wang, L., Xu, C., Wang, C., Wang, Y. (2012). Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 12:118.
- Wang, M., Zou, Z., Li, Q., Sun, K., Chen, X., Li, X. (2017). The *CsHSP17.2* molecular chaperone is essential for thermotolerance in *Camellia sinensis*. *Scientific Reports*, 7:1237.
- Wang, X., Xue, B., Dai, J., Qin, X., Liu, L., Chi, Y., Jones, J. T., Li, H. (2018) A novel *Meloidogyne ncognita* chorismate mutase effector suppresses plant immunity by manipulating the salicylic acid pathway and functions mainly during the early stages of nematode parasitism. *Plant Pathology*, 67(6):1436-1448.
- Wang, Y., Yang, L., Chen, X., Ye, T., Zhong, B., Liu, R., Wu, Y., Chan, Z. (2016b). Major latex protein-like protein 43 (MLP43) functions as a positive regulator during abscisic acid responses and confers drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(1):421-434.
- Wang, Z., Yan, S., Liu, C., Chen, F., Wang, T. (2012). Proteomic analysis reveals an aflatoxin-triggered immune response in cotyledons of *Arachis hypogaea* infected with *Aspergillus flavus*. *Journal of Proteome Research*, 11(5):2739-2753.
- Withers, J., Dong, X. (2017). Post-translational regulation of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 38:124-132.
- Wolters, D. A., Washburn, M. P., Yates, J. R. (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical chemistry* 73(23), 5683-5690.
- Wu, L., Wang, S., Wu, J., Han, Z., Wang, R., L., W., Zhan, H. (2015). Phosphoproteomic analysis of the resistant and susceptible genotypes of maize infected with *sugarcane mosaic virus*, *Amino Acids*, 47(3):483-496.
- Wu, S., Ning, F., Zhang, Q., Wu, X., Wang, W. (2017). Enhancing omics research of crop responses to drought under field conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8:174.
- Wu, T. D., Nacu, S. (2010). Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* 26(7), 873-881.

- Wu, T. D., Watanabe, C. K. (2005). GMAP: a genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics* 21(9), 1859-1875.
- Wyss, U., Grundler, F. M. W., Mùch, A. (1992). The parasitic behavior of second-stage juveniles in *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38(1), 98-111.
- Xiao, X., Yang, F., Zhang, S., Korpelainen, H., Li, C. (2009). Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum*, 136(2):150-168.
- Xu, W., Lv, H., Zhao, M., Li, Y., Qi, Y., Peng, Z., Xia, G., Wang, M. (2016). Proteomic comparison reveals the contribution of chloroplast to salt tolerance of a wheat introgression line. *Scientific Reports*, 6:32384.
- Xu, W., Zhou, T., An, B., Xu, B., Li, G. (2018). Evolution analysis and expression divergence of the chitinase gene family against *Leptosphaeria maculans* and *Sclerotinia sclerotiorum* infection in *Brassica napus*. *bioRxiv*, 281923.
- Yang, B., Zhou, X., Xu, R., Wang, J., Lin, Y., Pang, Wu, S., Zhong, F. (2016). Comprehensive analysis of photosynthetic characteristics and quality improvement of purple cabbage under different combinations of monochromatic light. *Frontiers in Plant Science*, 7:1788.
- Yang, C. L., Liang, S., Wang, H. Y., Han, L. B., Wang, F. X., Cheng, H. Q., Wu, X. M., Qu, Z. L., Wu, J. H., Xia, G. X. (2015). Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive factor 6 in defense against *Verticillium dahlia*. *Molecular Plant*, 8(3):399-411.
- Yang, L., Xie, C., Li, W., Zhang, R., Jue, D., Yang, Q. (2013) Expression of a wild eggplant ribosomal protein L13a in potato enhances resistance to *Verticillium dahlia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115(3):329-340.
- Yao, L. M., Jiang, Y. N., Lu, X. X., Wang, B., Zhou, P., Wu, T. L. (2016). Overexpression of a glycine-rich protein gene in *Lablab purpureus* improves abiotic stress tolerance. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 15(4).
- Ye, H., Roorkiwal, M., Valliyodan, B., Zhou, L., Chen, P., Varshney, R. K., Nguyen, H. T. (2018). Genetic diversity of root system architecture in response to drought stress in grain legumes. *Journal of Experimental Botany*, 69(13):3267-3277.
- Ye, T., Shi, H., Wang, Y., Chan, Z. (2015). Contrasting changes caused by drought and submergence stresses in Bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Frontiers in Plant Science*, 6:951.
- Yin, D., Wang, Y., Zhang, X., Li, H., Lu, X., Zhang, J., Zhang, W., Chen, S. (2013). De novo assembly of the peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed transcriptome revealed candidate unigenes for oil accumulation pathways. *PLoS One* 8(9), 11 p.
- Yin, F., Qin, C., Gao, J., Liu, M., Luo, X., Zhang, W., Liu, H., Liao, X., Shen, Y., Mao, L., Zhang, Z., Lin, H., Lübberstedt, T., Pan, G. (2015). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive genes and microRNAs in tobacco. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3):5714-5740.
- You, X., Yang, L-T., Lu, Y-B., Li, H., Zhang, S-Q., Chen, L-S. (2014). Proteomic changes of Citrus roots in response to long-term manganese toxicity. *Trees*, 28:1383-1399.
- Young, N. D., Weeden, N. F., Kochert, G. (1996). Genome mapping in legumes (Family Fabaceae). In: Peterson, A. H. (Ed.), *Genome mapping in plants*. Landes Biomedical Press, Austin, Texas, USA, pp. 212-227.
- Yu, L-X., Djebrouni, M., Chamberland, H., Lafontaine, J. G., Tabaeizadeh, Z. (1998). Chitinase: Differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild (*Lycopersicon chilense* Dun.) and cultivated (*L. esculentum* Mill.) tomatoes. *Journal of Plant Physiology*, 153(5-6):745-753.

- Yu, M., Yun, B.-W., Spoel, S. H., Loake, G. J. (2012). A sleigh ride through the SNO: regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4):424-430.
- Yu, X., Yang, A., James, A. T. (2017). Comparative proteomic analysis of drought response in roots of two soybean genotypes. *Crop and Pasture Science*, 68:609-619.
- Zaefyzadeh, M., Quliyev, R. A., Babayeva, S. M., Abbasov, M. A. (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of Biology*, 33:1-7.
- Zhang, J., Kopparapu, N. K., Yan, Q., Yang, S., Jiang, Z. (2013). Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. *Food Chemistry*, 138(2-3):1225-1232.
- Zhang, J., Liang, S., Duan, J., Wang, J., Chen, S., Cheng, Z., Zhang, Q., Liang, X., Li, Y. (2012). De novo assembly and Characterisation of the Transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Genomics* 13(90), 6 p.
- Zhang, J., Xu, X., Gao, M., Yang, P., Zhang, X. (2007). Comparison of 2-D LC and 3-D LC with post- and pre-tryptic-digestion SEC fractionation for proteome analysis of normal human liver tissue. *Proteomics* 7(4), 500-512.
- Zhang, N., Li, R., Shen, W., Jiao, S., Zhang, J., Xu, W. (2018). Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of major latex protein (*MLP*) family genes in *Vitis vinifera*. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(5):1061-1075.
- Zhang, W. W., Jian, G. L., Jiang, T. F., Wang, S. Z., Qi, F. J., Xu, S. C. (2012). Cotton gene expression profiles in resistant *Gossypium hirsutum* cv. Zhongzhimian KV1 responding to *Verticillium dahliae* strain V991 infection. *Molecular Biology Reports*, 39(10):9765-9774.
- Zhang, Y.-h., Chen, C., Shi, Z.-h., Cheng, H.-m., Bing, J., Ma, X.-f., Zheng, C.-x., Li, H.-j., Zhang, G.-f. (2018). Identification of salinity-related genes in ENO2 mutant (*eno2-*) of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1):94-110.
- 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.
- Zhao, C., Zhao, S., Hou, L., Xia, H., Wang, J., Li, C., Li, A., Li, T., Zhang, X., Wang, X. (2015). Proteomics analysis reveals differentially activated pathways that operate in peanut gynophores at different developmental stages. *BMC Plant Biology*, 15(1):188.
- Zhao, X., Li, C., Yan, C., Wang, J., Yuan, C., Zhang, H., Shan, S. (2019). Transcriptome and proteome analyses of resistant pre-harvest peanut seed-coat in response to *Aspergillus flavus* infection. *Electronic Journal of Biotechnology*, 40.
- Zhou, L., Chen, F., Pan, H., Ye, J., Dong, X., Li, C., Lin, F. (2016). Identifying virulence-associated genes using transcriptomic and proteomic association analyses of the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus mucronatus*. *International Journal of Molecular Sciences* 17(9), 17 p.
- Zhou, T., Wang, X., Luo, J., Ye, B., Zhou, Y., Zhou, L., Lai, T. (2018). Identification of differentially expressed genes involved in spore germination of *Penicillium expansum* by comparative transcriptome and proteome approaches. *MicrobiologyOpen*, 7(3):e00562.
- Zhu, W., Zhang, E., Li, H., Chen, X., Zhu, F., Hong, Y., Liao, B., Liu, S., Liang, X. (2013). Comparative proteomics analysis of developing peanut aerial and subterranean pods identifies pod swelling related proteins. *Journal of Proteomics*, 91:172-187.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in Immunology* 20(1), 10-16.
- Zlatev, Z., Lidon, F. C. (2012). An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis.

Zoschke, R., Nakamura, M., Liere, K., Sugiura, M., Börner, T., Schmitz-Linneweber, C. (2010). An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:3245-3250.

APÊNDICES

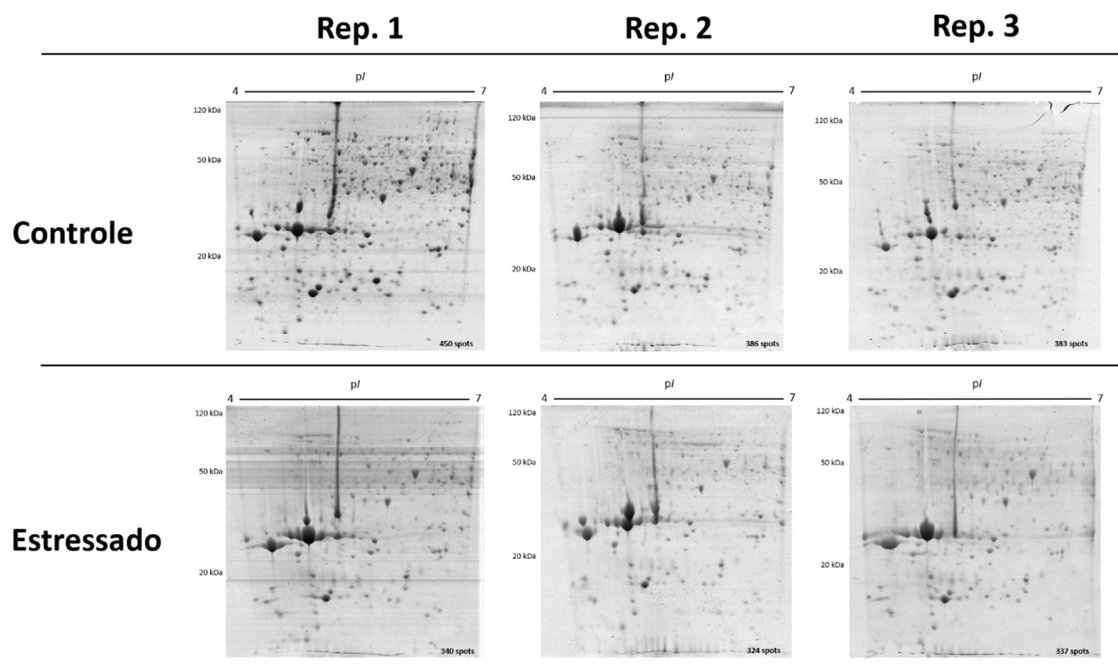


Figura Suplementar 1 – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico. Controle (NTR: 1,0); Estressado (NTR < 0,3).

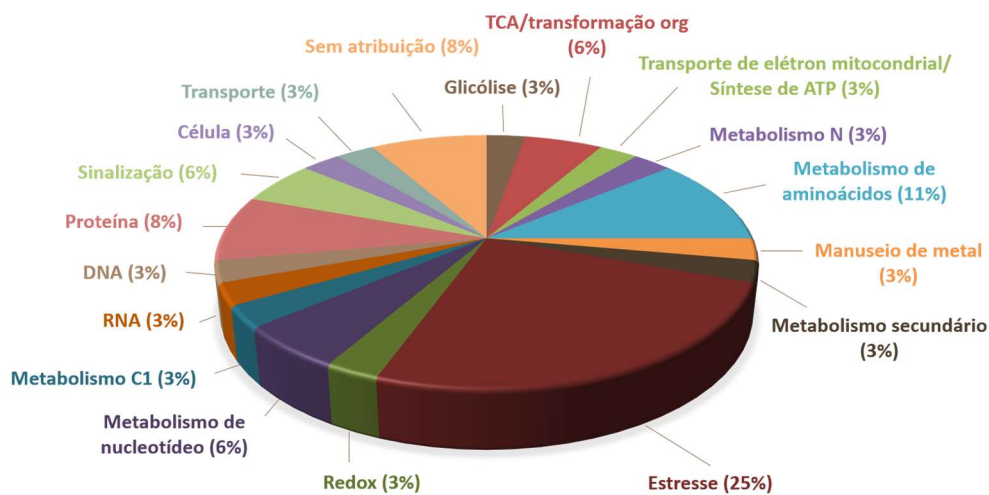


Figura Suplementar 2 - Visão geral da categorização funcional, usando a ferramenta de anotação de sequência Mercator, das 31 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) identificadas em raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico.

Tabela Suplementar 1 - Análise de classes com as proteínas diferencialmente abundantes obtidas a partir da comparação entre plantas de *Arachis silvestres* estressadas e controle fornecidas pelo *Image Master 2D Platinum* (GE Healthcare).

ID do match	Contagem do match	Raiz controle*	Raiz estressada *	ANOVA	Fold Change¹
32	2	0,0482418	0,0870918	0,014858	1,18
33	2	0,23127	0,105772	0,035633	-2,19
41	2	0,249933	0,174892	0,014851	-1,43
47	2	0,0458252	0,226408	0,034544	4,94
52	2	0,3765	0,237062	0,035206	-1,59
71	2	0,055849	0,164396	0,03545	2,94
87	2	0,0715142	0,254977	0,026471	3,57
88	2	0,17775	0,0917588	7,01E+01	-1,94
101	2	0,77927	0,538346	0,01627	-1,45
104	2	0,368706	0,762975	0,010578	2,07
105	2	1,59787	2,53704	0,021991	1,59
122	2	0,116647	0,134439	0,043251	1,15
147	2	0,713788	0,33643	0,030583	-2,12
158	2	0,387559	0,163613	0,016872	-2,37
159	2	0,133715	0,206325	0,049258	1,54
164	2	0,179703	0,0340974	0,014795	-5,27
178	2	0,226194	0,0947928	0,005434	-2,39
184	2	0,52959	0,156034	0,010144	-3,39
196	2	0,104505	0,301993	0,02595	2,89
220	2	0,305196	0,497531	0,022632	1,63
222	2	0,243041	0,0481237	0,033162	-5,05
223	2	0,198052	0,045536	0,034328	-4,35
224	2	0,184323	0,0257837	0,027252	-7,15
226	2	0,0530833	0,0996973	0,00469	1,88
235	2	0,184521	0,0738373	0,02977	-2,50
246	2	0,10868	0,0744107	0,008106	-1,46
252	2	0,0221076	0,169604	0,009872	7,67
257	2	0,749058	0,128745	0,015907	-5,82
258	2	0,181881	0,457006	0,003026	2,51
266	2	0,0270554	0,251356	0,003635	9,29
267	2	0,152887	0,0344228	0,033146	-4,44
269	2	0,176879	0,0328679	0,015356	-5,38
270	2	0,384211	0,12008	0,048247	-3,20
277	2	0,0123968	0,18191	0,020835	14,67
282	1		0,0678725	4,56E+00	Exclusivo ao estressado
291	1		0,297342	0,019665	Exclusivo ao estressado
298	1		0,0840206	9,84E+00	Exclusivo ao estressado
314	1	0,0393591		0,002624	Exclusivo ao controle
318	1	0,526272		0,007303	Exclusivo ao controle

(Continua na próxima página)

322	1	0,13816		0,005382	Exclusivo ao controle
327	1	0,259621		9,44E-01	Exclusivo ao controle
329	1	0,199568		0,00406	Exclusivo ao controle
330	1	0,151594		0,005516	Exclusivo ao controle
332	1	0,204669		3,42E+00	Exclusivo ao controle
333	1	0,114753		0,002526	Exclusivo ao controle
335	1	0,0810845		1,95E-06	Exclusivo ao controle
341	1	0,111541		0,004859	Exclusivo ao controle
346	1	0,104838		0,003721	Exclusivo ao controle
348	1	0,165911		0,031222	Exclusivo ao controle
352	1	0,10399		3,88E+01	Exclusivo ao controle
356	1	0,114188		0,004637	Exclusivo ao controle
359	1	0,0766009		0,006598	Exclusivo ao controle
360	1	0,18125		0,001153	Exclusivo ao controle
361	1	0,0961019		0,049568	Exclusivo ao controle
362	1	0,0909524		0,004247	Exclusivo ao controle
363	1	0,176415		0,002288	Exclusivo ao controle
391	1	0,0471758		1,28E+01	Exclusivo ao controle
392	1	0,123057		0,003738	Exclusivo ao controle
394	1	0,0880405		0,001511	Exclusivo ao controle

*Volume do spot

¹Fold Change é expressado pela razão entre o volume da amostra estressada e controle. Spots proteicos exclusivos são listados como tal.

O sinal "-" indica proteínas diminuídas.

Tabela Suplementar 2 - Análise comparativa entre os dados proteômicos e transcritômicos (*in silico* e RT-qPCR) obtidos de plantas de *A. duranensis* durante o estresse hídrico.

Spot proteico	Abreviação	Modelo gênico ^a	Fold Change ^b		
			Proteômico ^c	Transcritômico ^d	RT-qPCR ^e
33	Easelll	Aradu.US1J2	-2,19	-2,29	-1,08
41	NDPK-1	Aradu.EGV3U	-1,43	-1,80	-3,44
47	DOT-1	No hit*	4,94	0*	1,20
52	MLP-43	Aradu.E97J6	-1,59	-1,27	-1,72
87	POZ	Aradu.6D72R	3,57	1,95	-1,55
88	CHI-2	Aradu.HR1QJ	-1,94	-1,64	-1,54
101	APX	Aradu.l62QK	-1,45	-1,83	-1,42
104	MSL α	Aradu.R07DC	2,07	0*	-1,15
105	ManGlcBI	Aradu.R07DC	1,59	0*	1,18
122	PSMA6	Aradu.K48ZV	1,15	-1,29	-1,10
147	ANX	Aradu.9BC7H	-2,12	1,39	-1,17
158	GS56	Aradu.G6IK8	-2,37	-3,11	-5,49
178	SAM	Aradu.RXW02	-2,39	0*	-5,00
184	ENO	Aradu.JVB3U	-3,39	-1,75	-1,62
196	ATPase	Aradu.NI3KM	2,89	-1,57	-1,86

(Continua na próxima página)

220	HSP70	Aradu.24A4H	1,63	1,16	-1,38
224	HypP	Aradu.AVD8P	-7,15	-2,00	-1,73
246	MDH	Aradu.7K065	-1,46	-11,00	-2,72
252	MatK	Aradu.0X4JL	7,67	-8,51	-1,45
257	MLP-34	Aradu.D4Z5N	-5,82	-3,00	-1,75
258	HSP17.3	Aradu.XQ3RE	2,51	-2,37	-1,01
266	MLP-34	Aradu.D4Z5N	9,29	-3,00	-1,75
270	SHMT4	Aradu.BAW60	-3,20	-1,38	1,04
291	Cht2	Aradu.4196P	Exclusivo ao estressado	1,37	12,42
327	TFIIF	Aradu.NGG06	Exclusivo ao controle	-1,48	0*
332	SRPBCC	Aradu.VF89S	Exclusivo ao controle	2,46	-5,78
335	APRT	Aradu.VF877	Exclusivo ao controle	-1,38	-4,26
348	Leo-1	Aradu.BR9PD	Exclusivo ao controle	-1,12	-1,19
360	HSP70	Aradu.24A4H	Exclusivo ao controle	1,16	-1,38
361	MetE	Aradu.II7B4	Exclusivo ao controle	-1,14	-4,03
392	TMED	Aradu.ANX9X	Exclusivo ao controle	-1,52	-2,41

^aBanco de dados de seqüências genômicas de *A. duranensis* usado para pesquisar transcritos correspondentes às proteínas identificadas. Esses modelos genéticos também foram usados para desenhar os *primers* obtidos na análise RT-qPCR.

^b*Fold change* da relação entre raízes estressadas e controle de *A. duranensis* obtida por análise proteômica, transcriptômica e RT-qPCR.

^c*Fold change* obtida pela análise 2-DE de raízes submetidas ao estresse hídrico.

^d*Fold change* obtida por dados transcritômicos (*in silico*-RNA-Seq) de raízes de *A. duranensis* submetidas ao estresse hídrico gradual (dados não publicados).

^e*Fold change* obtida de transcritos correspondentes às proteínas identificadas por 2-DE de raízes submetidas a estresse hídrico.

* "No hit" - não encontrada a seqüência genômica correspondente nos dados transcritômicos. O valor igual a "0" representa nenhuma expressão no transcrito de *A. duranensis* ou nenhuma amplificação por RT-qPCR.

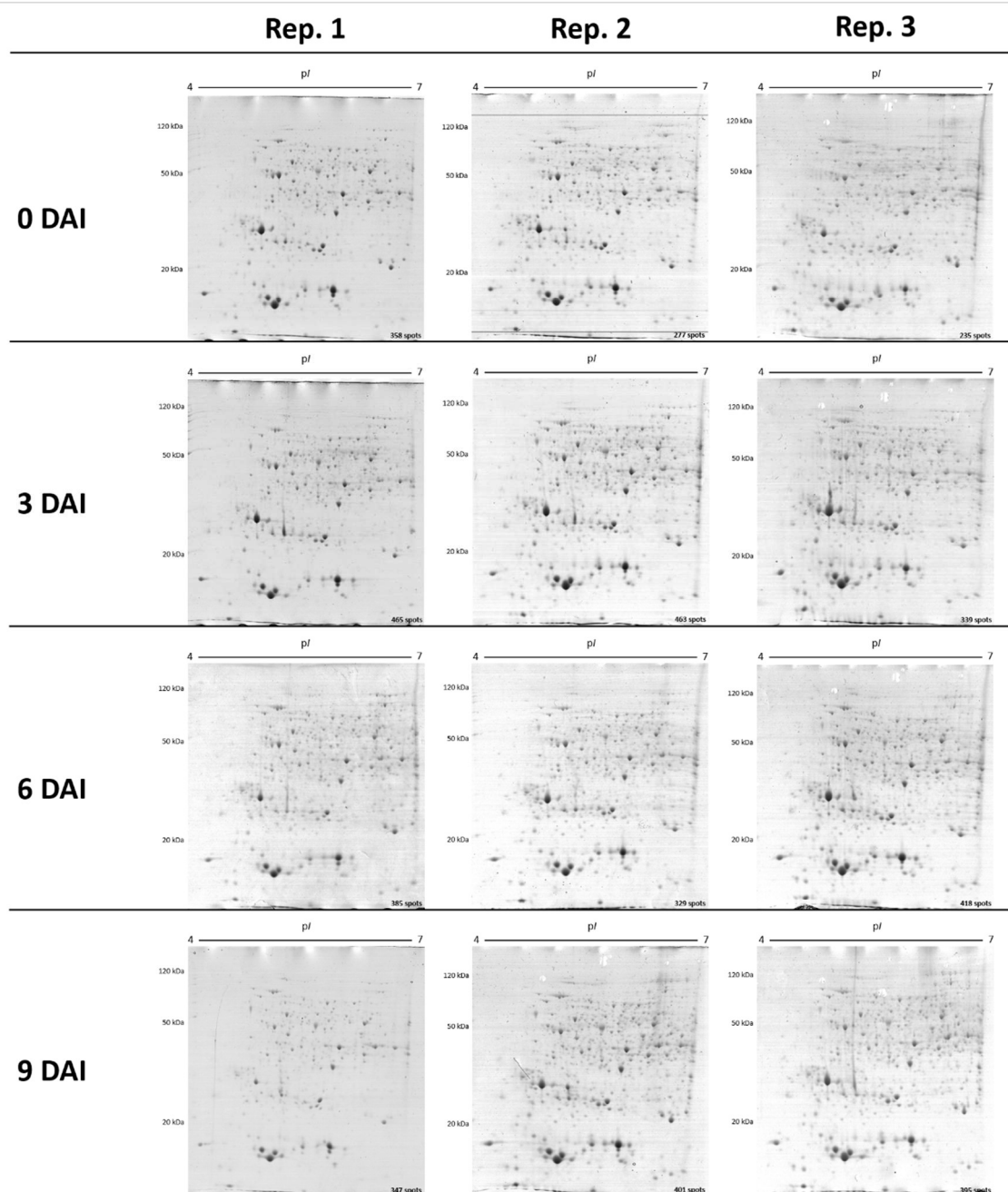


Figura Suplementar 3 – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de *A. stenosperma* não inoculada (0 DAI) e inoculadas com *M. arenaria* (3, 6 e 9 DAI). DAI – dias após a inoculação.

Tabela Suplementar 3 - Proteínas diferencialmente abundantes de raízes de *A. stenosperma* controle e inoculadas com *M. arenaria*, identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E.



ID do transcrito e categoria funcional ^a	Anotação NCBI	Perfil CTR ^b	Perfil CTR (DP) ^c	Perfil INOC ^b	Perfil INOC (DP) ^c	Fold change Proteômico ^d	Fold change - 3DAI	Transcritômico ^e 6DAI	Transcritômico ^e 9DAI	ID proteína (String) ^f <i>Arabidopsis thaliana</i>	Anotação (String) <i>Arabidopsis thaliana</i>	Identidade (String) <i>Arabidopsis thaliana</i>
Metabolismo de aminoácido (BIN 13)												
ASTER013547.89317	PREDICTED: Arachis duranensis fumarylacetoacetase (LOC107482939	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	1,07459	1,08658	1,10245	AT1G12050	fumarylacetoacetase	73%
ASTER006623.50756	PREDICTED: Arachis duranensis adenosylhomocysteinase (LOC10748	0,98	0,01	1,02	0,01	1,04	1,02976	1,16082	1,08537	HOG1	adenosylhomocysteinase 1;	92%
ASTER001766.15587	PREDICTED: Arachis duranensis asparagine synthetase [glutamine-l	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	-1,1067	-2,00584	-1,53448	ASN1	glutamine-dependent aspara	94%
ASTER010518.73512	PREDICTED: Arachis duranensis S-adenosylmethionine synthase (LC	1,11	0,02	0,99	0,02	-1,12	1,73557	2,50823	1,78219	MTO3	METHIONINE OVER-ACCUMU	84%
ASTER009061.65339	PREDICTED: Arachis ipaensis alanine aminotransferase 2 (LOC10762	0,9	0,02	1,01	0,03	1,12	1,17496	-1,19115	-1,07387	ALAAT2	alanine aminotransferase 2	77%
ASTER017683.108809	PREDICTED: Arachis ipaensis 60S acidic ribosomal protein P0 (LOC10	0,91	0,02	1,06	0,02	1,16	1,17576	1,34275	1,16449	OASA1	cysteine synthase	81%
ASTER018990.114593	PREDICTED: Arachis duranensis cysteine synthase (LOC107465607), tr	0,92	0,02	1,05	0,02	1,14	1,17576	1,34275	1,16449	OASA1	cysteine synthase	81%
Biodegradação de xenobióticos (BIN 24)												
ASTER019866.118356	PREDICTED: Arachis duranensis putative lactoylglutathione lyase (Li	0,89	0,03	1,1	0,03	1,24	1,14054	1,05891	1,14972	GLX1	glyoxalase I homolog	83%
Metabolismo C1 (BIN 25)												
ASTER015460.98741	PREDICTED: Arachis duranensis formate dehydrogenase 1, mitochor	0,93	0,04	1,04	0,04	1,12	1,09027	-1,27307	1,0088	FDH	Formate dehydrogenase	85%
ASTER011849.80593	PREDICTED: Arachis duranensis serine hydroxymethyltransferase 4 (0,97	0,02	1,02	0,03	1,05	1,26793	1,49961	1,16727	SHM4	serine hydroxymethyltransfe	88%
Parede celular (BIN 10)												
ASTER018405.112046	PREDICTED: Arachis duranensis alpha-1,4-glucan-protein synthase [1,01	0,04	1,04	0,04	1,03	1,65093	1,7922	1,50109	RGP2	reversibly glycosylated polyt	88%
ASTER026374.144122	PREDICTED: Arachis duranensis expansin-like B1 (LOC107484932), mf	0,62	0,03	1,39	0,03	2,24	-1,12896	-1,71086	-2,42613	EXLB1	expansin-like B1	49%
ASTER009544.68089	PREDICTED: Arachis ipaensis pectinesterase (LOC107643277), mRNA	1,02	0,02	0,99	0,02	0,97	-1,14095	-1,42729	-1,26386	PMEPCRA	methylesterase PCR A; Acts	56%
Célula (BIN 31)												
ASTER013816.90601	PREDICTED: Arachis ipaensis peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (LC	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	1,47295	1,52517	1,5266	ROC1	rotamase CYP 1; PPlases ac	85%
ASTER033549.168401	PREDICTED: Arachis ipaensis peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (LC	0,95	0,02	1,04	0,02	1,09	1,47295	1,52517	1,5266	ROC1	rotamase CYP 1; PPlases ac	85%
ASTER003403.28659	PREDICTED: Arachis duranensis cell division cycle protein 48 homol	0,95	0,02	1	0,02	1,05	-1,03896	1,02915	-1,16088	AtCDC48C	cell division cycle 48C; Probe	93%
ASTER013081.86970	PREDICTED: Arachis duranensis GTPase Der (LOC107473220), transcri	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,23176	1,32587	1,16296	PFN2	profilin 2; Binds to actin and i	80%
ASTER018778.113636	PREDICTED: Arachis duranensis annexin D1 (LOC107459113), mRNA	0,75	0,04	1,19	0,04	1,59	-1,08625	-1,22691	-1,0022	ANNAT1	annexin 1; Has a peroxidase	76%
ASTER007770.57773	PREDICTED: Arachis duranensis actin-7 (LOC107468573), transcript va	0,9	0,02	1,1	0,03	1,22	1,01521	-1,09873	1,0004	ACT7	actin 7; Actins are highly cor	95%
ASTER011485.78711	PREDICTED: Arachis duranensis actin-7 (LOC107470345), mRNA	0,88	0,01	1,12	0,01	1,27	1,80262	1,37327	1,70332	ACT7	actin 7; Actins are highly cor	99%
ASTER015675.99759	PREDICTED: Arachis ipaensis actin-3 (LOC107645412), mRNA	0,91	0,01	1,08	0,03	1,19	1,14223	1,0916	1,17885	ACT12	actin-12; Actins are highly ct	97%
ASTER072017.261234	PREDICTED: Bactrocera cucurbitae actin-2, muscle-specific (LOC10522	0,89	0,01	1,14	0,01	1,28	1,14223	1,0916	1,17885	ACT11	actin-11; Actins are highly ct	98%
ASTER007581.56569	PREDICTED: Arachis duranensis tubulin alpha-3 chain (LOC10748225)	0,99	0,02	1,05	0,02	1,06	1,20578	1,17271	1,21924	TUA3	tubulin alpha-3; Tubulin is the	98%
ASTER018735.113468	PREDICTED: Arachis duranensis tubulin alpha-4 chain (LOC10746103)	0,97	0,02	1,05	0,02	1,08	-1,04804	1,05797	1,17749	TUA4	tubulin alpha-4 chain	98%
ASTER048027.209043	PREDICTED: Arachis duranensis tubulin alpha-2 chain (LOC10748760)	0,98	0,02	1,05	0,02	1,07	1,48917	1,95281	1,54567	TUA6	Tubulin alpha-6; Tubulin is th	81%
ASTER091976.295935	Neobodo designis clone ndtub2 beta tubulin gene, partial cds	0,95	0,03	1	0,04	1,05	-1,05466	-1,09277	1,0242	TUB1	tubulin beta; Tubulin is the m	89%
Desenvolvimento (BIN 33)												
ASTER018252.111351	PREDICTED: Arachis ipaensis uncharacterized LOC107629071 (LOC107	0,94	0,03	1,01	0,03	1,07	1,31811	1,44378	1,34429	AT2G44060	Late embryogenesis abunda	75%
ASTER012804.85582	PREDICTED: Arachis duranensis patatin-like protein 2 (LOC10748718)	0,73	0,03	0,98	0,06	1,34	1,98257	2,1124	2,22644	PLP1	patatin-like protein	41%
ASTER019943.118669	PREDICTED: Arachis duranensis patatin-like protein 2 (LOC10748718)	1,05	0,01	0,59	0,01	-1,78	1,98257	2,1124	2,22644	PLA2A	phospholipase A 2A	44%
DNA (BIN 28)												
ASTER031158.160632	PREDICTED: Arachis duranensis histone H2A (LOC107476865), mRNA	0,92	0,02	1,27	0,02	1,38	1,66063	1,73816	1,4063	HTA12	histone H2A 12	74%
ASTER027818.149241	PREDICTED: Arachis duranensis probable histone H2B.3 (LOC107474C	0,78	0,01	1,11	0,01	1,42	1,06957	1,32135	1,12429	AT2G37470	histone H2B; Core componer	90%
ASTER083177.281495	Parastrongyloides trichosuri genome assembly_P_trichosuri_KNP_sc	0,88	0,02	1,17	0,03	1,33	1,27685	1,42234	1,18628	AT1G09200	histone H3	87%
Fermentação (BIN 5)												
ASTER004146.34267	PREDICTED: Arachis ipaensis alcohol dehydrogenase 1 (LOC1076059)	0,66	0,02	1,45	0,02	2,20	1,96208	2,04581	1,34514	ADH1	alcohol dehydrogenase 1	85%
ASTER008763.63577	PREDICTED: Arachis ipaensis alcohol dehydrogenase (LOC107623830	0,73	0,02	1,18	0,03	1,62	1,9132	2,14332	1,12159	ADH1	alcohol dehydrogenase 1	86%
Glicólise (BIN 4)												
ASTER012874.85947	PREDICTED: Arachis duranensis enolase 2 (LOC107493803), mRNA	0,98	0,01	1,1	0,01	1,12	1,07726	1,03926	1,09979	LOS2	LOW EXPRESSION OF OSMC	89%
ASTER011822.80459	PREDICTED: Arachis ipaensis glyceraldehyde-3-phosphate dehydrog	0,87	0,02	1,09	0,02	1,25	1,12029	-1,028	1,18795	GAPC2	glyceraldehyde 3-phosphate	92%
ASTER018476.112353	Arachis hypogaea cultivar E11 phosphoenolpyruvate carboxylase (Pf	0,98	0,02	0,99	0,02	1,01	-1,2273	-1,41703	-1,19487	PPC1	phosphoenolpyruvate carbo;	86%
ASTER008809.63883	PREDICTED: Arachis duranensis phosphoglucomutase, cytoplasmic (0,86	0,02	1,1	0,02	1,28	1,18827	1,17701	1,14405	PGM3	phosphoglucomutase 3; This	87%
ASTER007390.55440	PREDICTED: Arachis duranensis 2,3-bisphosphoglycerate-independe	0,93	0,02	1	0,03	1,08	1,04686	-1,25683	-1,08996	IPGAM2	2,3-biphosphoglycerate-inde	86%
ASTER008299.60894	PREDICTED: Arachis ipaensis pyruvate kinase 1, cytosolic (LOC10762	0,87	0,03	1,04	0,03	1,20	1,16001	1,10766	-1,01364	AT3G52990	pyruvate kinase	89%

(Continua na próxima página)



ID do transcrito e categoria funcional ^a	Anotação NCBI	Perfil CTR ^b	Perfil CTR (DP) ^c	Perfil INOC ^b	Perfil INOC (DP) ^c	Fold change Proteômico ^d	Fold change 3DAI	Fold change 6DAI	Transcritômico ^e 9DAI	ID proteína (String) ^f <i>Arabidopsis thaliana</i>	Anotação (String) <i>Arabidopsis thaliana</i>	Identidade (String) <i>Arabidopsis thaliana</i>
ASTER023054.131407	PREDICTED: Arachis duranensis triosephosphate isomerase, cytosol	0,96	0,02	1,02	0,01	1,06	1,35249	1,47451	1,3271	TPI	triosephosphate isomerase	81%
ASTER036587.177686	PREDICTED: Arachis duranensis triosephosphate isomerase, cytosol	0,98	0,02	1,02	0,02	1,04	1,35249	1,47451	1,3271	TPI	triosephosphate isomerase	77%
ASTER011724.79959	PREDICTED: Arachis duranensis UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0,88	0,02	1,17	0,02	1,33	1,10829	1,05356	1,15014	UGP2	UDP-glucose pyrophosphorylation	85%
ASTER008908.64457	PREDICTED: Arachis duranensis pyruvate kinase, cytosolic isoform	0,88	0,03	1,09	0,03	1,24	-1,06628	-1,0452	-1,01225	AT5G56350	pyruvate kinase	89%
ASTER011750.80091	PREDICTED: Arachis duranensis fructose-bisphosphate aldolase, cytosolic	0,9	0,01	1,1	0,01	1,22	1,21937	1,16647	1,15977	FBA6	fructose-bisphosphate aldolase	88%
Metabolismo de hormônio (BIN 17)												
ASTER008920.64531	PREDICTED: Arachis duranensis cytokinin dehydrogenase 2 (LOC107492465)	0,93	0,02	1,03	0,01	1,11	1,9979	2,33758	1,54641	CKX4	cytokinin oxidase 4; Catalyzes the conversion of cytokinins to inactive cytokinins	45%
ASTER003079.26128	PREDICTED: Arachis duranensis linoleate 9S-lipoxygenase 1 (LOC107492465)	0,72	0,01	1,12	0,01	1,56	1,03365	-1,00655	1,17495	LOX1	lipoxygenase 1; 9S-lipoxygenase	56%
ASTER003213.27185	PREDICTED: Arachis duranensis seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 (LOC107492465)	0,79	0,01	1,12	0,01	1,42	-1,41548	-1,51041	-1,06037	LOX1	lipoxygenase 1; 9S-lipoxygenase	58%
ASTER003374.28417	PREDICTED: Arachis duranensis linoleate 9S-lipoxygenase (LOC107492465)	0,77	0,01	1,01	0,01	1,31	1,25233	1,11215	1,47177	LOX1	lipoxygenase 1; 9S-lipoxygenase	57%
ASTER017214.106781	PREDICTED: Arachis ipaensis seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 (LOC107492465)	0,79	0,01	1,1	0,01	1,39	-1,09139	-1,03633	1,03839	LOX1	lipoxygenase 1; 9S-lipoxygenase	56%
ASTER017946.109979	PREDICTED: Arachis duranensis seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 (LOC107492465)	0,78	0,01	1,1	0,01	1,41	-1,09139	-1,03633	1,03839	LOX1	lipoxygenase 1; 9S-lipoxygenase	56%
ASTER035601.174763	PREDICTED: Arachis ipaensis seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 (LOC107492465)	0,83	0,02	1,1	0,02	1,33	-1,09139	-1,03633	1,03839	LOX5	lipoxygenase 5; 9S-lipoxygenase	65%
ASTER042929.195724	PREDICTED: Arachis duranensis seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 (LOC107492465)	0,81	0,03	1,05	0,03	1,30	-1,09139	-1,03633	1,03839	LOX1	lipoxygenase 1; 9S-lipoxygenase	61%
ASTER054197.224053	PREDICTED: Arachis ipaensis seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 (LOC107492465)	0,74	0,02	1,16	0,02	1,57	-1,09139	-1,03633	1,03839	LOX5	lipoxygenase 5; 9S-lipoxygenase	70%
Metabolismo de lipídeos (BIN 11)												
ASTER017452.107787	PREDICTED: Arachis duranensis probable NAD(P)H dehydrogenase (ubiquinone)	0,94	0,01	1	0,01	1,06	1,30656	1,22733	1,35005	AT4G27270	Quinone reductase family protein	81%
ASTER026468.144448	PREDICTED: Arachis duranensis NAD(P)H dehydrogenase (ubiquinone)	0,96	0,01	1	0,01	1,04	1,97922	2,03088	1,69083	AT4G27270	Quinone reductase family protein	89%
ASTER044697.200415	PREDICTED: Arachis duranensis probable NAD(P)H dehydrogenase (ubiquinone)	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	FQR1	flavodoxin-like quinone reductase	82%
ASTER004260.35084	Arachis hypogaea pld2 mRNA for phospholipase D alpha 2, complete	0,8	0,02	1,15	0,02	1,44	-1,06704	1,00754	-1,00878	PLDAPHA1	phospholipase D alpha 1; Hydrolyzes phospholipids to diacylglycerol and phosphate	80%
Metabolismo de carboidratos maiores (BIN 2)												
ASTER012443.83744	PREDICTED: Arachis duranensis fructokinase-2 (LOC107461466), mRNA	1,01	0,01	0,98	0,02	-1,03	1,31455	1,28679	1,1522	AT3G59480	fructokinase; May play an important role in sucrose metabolism	82%
ASTER001675.14929	PREDICTED: Arachis duranensis sucrose synthase 2 (LOC107492465), mRNA	0,79	0,03	1,11	0,03	1,41	1,00697	1,13935	-1,11312	SUS3	sucrose synthase 3; Sucrose synthase	83%
ASTER002982.25370	PREDICTED: Arachis ipaensis sucrose synthase (LOC107638421), mRNA	1,24	0,01	0,82	0,01	-1,51	1,04403	-1,04039	-1,04093	SUS4	sucrose synthase 4; Sucrose synthase	86%
ASTER003395.28575	PREDICTED: Arachis duranensis sucrose synthase (LOC107496082), mRNA	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	SUS4	sucrose synthase 4; Sucrose synthase	85%
ASTER003473.29193	PREDICTED: Arachis duranensis sucrose synthase (LOC107479418), mRNA	1,14	0,01	0,89	0,01	-1,28	-1,37704	-1,80712	-1,26078	SUS4	sucrose synthase 4; Sucrose synthase	85%
ASTER003770.31465	PREDICTED: Arachis duranensis 5-methyltetrahydropteroylglutamate synthase	1,03	0,01	1	0,01	-1,03	1,05935	1,25592	1,12287	SUS4	methionine synthase 1; Catalyzes the conversion of methionine to S-adenosylmethionine	87%
ASTER004647.37783	PREDICTED: Arachis duranensis subtilisin-like protease SBT1.6 (LOC107492465)	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	SUS1	sucrose synthase 1; Sucrose synthase	88%
"Manuseio" de metal (BIN 15)												
ASTER023060.131434	PREDICTED: Arachis duranensis rhicadhesin receptor (LOC107492253)	0,95	0,02	1,1	0,02	1,16	2,56381	3,60394	2,57214	GLP10	germin-like protein 10; May play a role in copper homeostasis	74%
ASTER036893.178592	PREDICTED: Arachis duranensis copper transport protein ATX1 (LOC107492253)	0,87	0,03	1,15	0,02	1,32	1,90963	2,75288	2,03189	CCH	copper chaperone	65%
Miscelânea (BIN 26)												
ASTER026605.144940	PREDICTED: Arachis duranensis stem 28 kDa glycoprotein (LOC107461466)	0,73	0,06	1,28	0,08	1,75	-1,33235	-2,10094	-1,40479	AT5G51260	HAD superfamily, subfamily I	53%
ASTER014352.93283	PREDICTED: Arachis duranensis alcohol dehydrogenase class-3 (LOC107492465)	0,79	0,12	1,05	0,13	1,33	1,37826	1,22515	1,31952	HOT5	alcohol dehydrogenase class 3	87%
ASTER017424.107653	PREDICTED: Arachis duranensis alcohol dehydrogenase class-3 (LOC107492465)	0,83	0,03	1,11	0,04	1,34	1,12599	1,16225	1,11927	HOT5	alcohol dehydrogenase class 3	89%
ASTER017854.109556	PREDICTED: Arachis duranensis D-amino-acid transaminase, chloroplast	0,97	0,03	1	0,03	1,03	-1,03239	1,21538	1,19444	ADCL	4-amino-4-deoxychorismate mutase	62%
ASTER022313.128441	PREDICTED: Arachis duranensis glutathione S-transferase L3 (LOC107492465)	1	0,02	1,08	0,02	1,08	1,36725	1,6531	1,47853	GSTL3	Glutathione transferase L3; (cytosolic)	68%
ASTER023585.133513	PREDICTED: Arachis ipaensis glutathione S-transferase F9 (LOC107638421)	0,81	0,02	1,21	0,02	1,49	-1,16277	-1,32678	-1,22429	GSTF9	glutathione S-transferase; in cytosol	61%
ASTER019077.115044	PREDICTED: Arachis duranensis epoxide hydrolase A-like (LOC107492465)	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	AT3G05600	alpha/beta-hydrolase domain	58%
ASTER015327.98083	PREDICTED: Arachis duranensis FAD-dependent urate hydroxylase (LOC107492465)	0,82	0,03	1,05	0,03	1,28	-1,22512	-1,655	-1,10024	AT4G38540	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase	57%
ASTER016175.102049	PREDICTED: Arachis duranensis 2-methylene-furan-3-one reductase	0,77	0,03	1,19	0,04	1,55	-1,10008	-1,00586	-1,2557	AOR	alkenal/one oxidoreductase	62%
ASTER016801.104909	PREDICTED: Arachis duranensis 2-methylene-furan-3-one reductase	0,94	0,02	1,12	0,02	1,19	1,27918	1,52949	1,27785	AOR	alkenal/one oxidoreductase	65%
ASTER021482.125021	PREDICTED: Arachis duranensis 2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)	0,96	0,02	1	0,02	1,04	1,32852	1,25129	1,34793	AT5G17000	2-alkenal reductase	71%
ASTER036067.176134	PREDICTED: Arachis duranensis 2-methylene-furan-3-one reductase	0,82	0,02	1,22	0,02	1,49	1,27918	1,52949	1,27785	AOR	alkenal/one oxidoreductase	66%
ASTER018246.111321	PREDICTED: Arachis duranensis peroxidase A2 (LOC107483151), mRNA	1	0,02	0,92	0,02	-1,09	1,16157	1,09354	-1,37495	AT2G38380	peroxidase 22; Removal of H ₂ O ₂	52%
ASTER021449.124880	PREDICTED: Arachis duranensis peroxidase A2 (LOC107483150), mRNA	0,9	0,02	0,97	0,02	1,08	1,30873	1,30619	1,23194	AT3G32980	peroxidase 32; Removal of H ₂ O ₂	57%
ASTER034035.169969	PREDICTED: Arachis ipaensis peroxidase 15 (LOC107638830), mRNA	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	PA2	peroxidase 2; Removal of H ₂ O ₂	65%
ASTER060542.238377	PREDICTED: Arachis duranensis peroxidase A2 (LOC107483153), mRNA	0,91	0,04	1,06	0,04	1,16	1,90666	2,09667	1,54948	PA2	peroxidase 2; Removal of H ₂ O ₂	61%

(Continua na próxima página)



ID do transcrito e categoria funcional ^a	Anotação NCBI	Perfil	Perfil CTR	Perfil	Perfil INOC	Fold change	Fold change	Transcritômico ^b			ID proteína (String) ^d	Anotação (String)	Identidade (String)
		CTR ^b	(DP) ^c	INOC ^b	(DP) ^c	Proteômico ^d	3DAI	6DAI	9DAI	<i>Arabidopsis thaliana</i>			
Transporte de elétron mitocondrial/Síntese de ATP (BIN 9)													
ASTER000272.1772	PREDICTED: Arachis duranensis ATP synthase subunit alpha, mitoch	0,96	0,01	1,03	0,02	1,07	0	0	0	0	ATP1	ATP synthase subunit 1; Mito	92%
ASTER006692.51175	PREDICTED: Arachis duranensis ATP synthase subunit beta, mitoch	0,93	0,01	1,09	0,01	1,17	1,30759	1,37779	1,30726	0	AT5G08680	ATP synthase subunit beta-2	86%
Metabolismo N (BIN 12)													
ASTER013112.87121	PREDICTED: Arachis duranensis glutamine synthetase leaf isozyme,	1,14	0,02	1,11	0,02	-1,03	1,48774	1,95689	1,94465	0	GS2	glutamine synthetase; The lig	83%
ASTER019143.115313	PREDICTED: Arachis ipaensis glutamine synthetase nodule isozyme	1	0,01	0,99	0,02	-1,01	1,48774	1,95689	1,94465	0	GLN1-1	glutamine synthetase clone R1	87%
Sem atribuição (BIN 35)													
ASTER017710.108919	PREDICTED: Arachis duranensis PLAT domain-containing protein 3 (L	0,7	0,03	1,27	0,03	1,81	-1,02989	-1,32912	-1,02912	0	PLAT2	PLAT domain protein 2	65%
ASTER020513.121069	PREDICTED: Arachis duranensis nitrile-specifier protein 5 (LOC10748	1,09	0,03	0,98	0,03	-1,11	1,15563	1,02293	1,2249	0	AT3G07720	galactose oxidase/kelech repr	71%
ASTER025234.139975	PREDICTED: Arachis duranensis uncharacterized protein At2g39795, i	1,08	0,04	1	0,04	-1,08	1,00255	-1,18953	-1,35842	0	AT5G02050	Mitochondrial glycoprotein fa	51%
ASTER031915.163090	PREDICTED: Arachis duranensis hypersensitive-induced response pi	0,78	0,05	1,23	0,06	1,58	1,25578	1,84101	1,10895	0	HIR1	HYPERSENSITIVE-INDUCED F	85%
ASTER035516.174493	PREDICTED: Arachis duranensis putative phosphatidylglycerol/phos	0,83	0,03	1,12	0,04	1,35	1,3976	1,54875	1,42162	0	AT3G44100	MD-2-related lipid recognition	58%
ASTER005020.40309	PREDICTED: Arachis duranensis polyvinylalcohol dehydrogenase (LOC107486736), transc	1,2	0,34	1,20	0,34	1,20	-1,15044	-1,00555	-1,14729	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER005132.41059	PREDICTED: Arachis duranensis polyphenol oxidase, chloroplastic (I	0,81	0,01	1,13	0,01	1,40	1,14717	1,53981	-1,11078	0	AT1G52140	uncharacterized protein	45%
ASTER008586.62536	PREDICTED: Arachis duranensis polyphenol oxidase A1, chloroplasti	0,82	0,01	1,15	0,02	1,40	1,40868	2,12584	1,49768	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER008831.64026	PREDICTED: Arachis duranensis polyphenol oxidase, chloroplastic (I	0,8	0,01	1,14	0,01	1,43	1,14717	1,53981	-1,11078	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER017466.107837	PREDICTED: Arachis duranensis cytochrome c1 (LOC107482936), trans	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	0	0	0	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER021411.124730	PREDICTED: Arachis ipaensis kunitz-type elastase inhibitor BrEI (LOI	1,02	0,02	1,05	0,03	1,03	-2,14838	-2,24025	-1,07865	0	AT1G17860	kunitz type trypsin and prote	35%
ASTER024586.137446	PREDICTED: Arachis duranensis pathogenesis-related protein 2 (LOI	0,97	0,03	1,02	0,02	1,05	1,5681	2,34172	1,07515	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER025609.141395	PREDICTED: Arachis duranensis ABA-responsive protein ABR17 (LOC1	0,69	0,01	1,07	0,01	1,55	1,84562	1,81183	1,59853	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER028179.150497	PREDICTED: Arachis duranensis pathogenesis-related protein 2 (LOI	0,91	0,01	1,12	0,01	1,23	1,5681	2,34172	1,07515	0	MPL423	MLP-like protein 423	29%
ASTER028464.151475	PREDICTED: Arachis duranensis kunitz-type trypsin inhibitor-like 2 p	1,04	0,03	0,93	0,02	-1,12	1,52435	1,40169	-1,0174	0	KT1.1	kunitz type trypsin and prote	33%
ASTER031041.160278	PREDICTED: Arachis duranensis glycine-rich protein DOT1 (LOC10746	0,84	0,03	1,24	0,03	1,48	0	0	0	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER031717.162457	PREDICTED: Arachis ipaensis protein SRC1 (LOC107604810), mRNA	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	0	0	0	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER033461.168136	PREDICTED: Arachis duranensis 60S acidic ribosomal protein P2A (LC	0,88	0,06	1,09	0,05	1,24	1,18808	1,15555	1,11637	0	AT3G44590	60S acidic ribosomal protein	68%
ASTER033760.169124	PREDICTED: Arachis duranensis uncharacterized LOC107496182 (LOC1	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	-1,3286	-1,32006	-1,1865	0	NOT FOUND	STRING found no matching protein in its database	
ASTER061854.241194	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein S28-like (LOC:	0,93	0,19	1,05	0,1	1,13	1,23196	1,08291	1,09559	0	RPS28	40S ribosomal protein S28-1	85%
ASTER073759.264513	PREDICTED: Arachis ipaensis uncharacterized LOC107610305 (LOC107	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	0	0	0	0	CRK8	cysteine-rich receptor-like pr	45%
Metabolismo de Nucleotídeo (BIN 23)													
ASTER026793.145598	PREDICTED: Arachis duranensis nucleoside diphosphate kinase 1 (L	0,89	0,03	1,08	0,02	1,21	1,36948	1,32027	1,25349	0	NDPK1	nucleoside diphosphate kina	83%
Pentose fosfato oxidativa (BIN 7)													
ASTER022531.129300	PREDICTED: Arachis duranensis ferredoxin, root R-B2 (LOC107467478)	0,95	0,06	1,01	0,06	1,06	1,9144	2,04244	1,57098	0	FD3	ferredoxin 3; Ferredoxins an	59%
ASTER014391.93478	PREDICTED: Arachis duranensis transaldolase (LOC107486867), trans	1,02	0,02	1	0,02	-1,02	1,21253	1,2823	1,26122	0	TRA2	transaldolase	79%
ASTER009244.66322	PREDICTED: Arachis duranensis 6-phosphogluconate dehydrogenasi	1	0,02	0,93	0,02	-1,08	1,17089	1,11525	1,04506	0	AT3G02360	6-phosphogluconate dehydr	90%
Proteína (BIN 29)													
ASTER008935.64622	PREDICTED: Arachis duranensis low-temperature-induced cysteine p	0,94	0,02	1,04	0,01	1,11	1,06233	1,45035	-1,00751	0	RD21A	cysteine proteinase RD21a	68%
ASTER042883.195604	PREDICTED: Arachis duranensis cullin-1 (LOC107483629), transcript va	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	-1,22669	-1,2477	-1,21389	0	CUL1	cullin 1; Involved in ubiquitina	82%
ASTER072454.262068	Lepeophtheirus salmonis clone Isal-evj-021-112 Ubiquitin putative	1	0,03	1,03	0,03	1,03	1,23052	1,44672	1,36593	0	UBQ	40S ribosomal protein S27a-	98%
ASTER006094.47432	PREDICTED: Arachis duranensis chaperonin CPN60-2, mitochondrial	1,02	0,03	0,96	0,03	-1,06	-1,36157	-1,79705	-1,17106	0	HSP60	chaperonin CPN60; Implicater	91%
ASTER022489.129133	PREDICTED: Arachis ipaensis 10 kDa chaperonin, mitochondrial (LOC	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,30367	-1,09644	1,28905	0	AT1G23100	GroES-like protein	73%
ASTER019767.117950	PREDICTED: Arachis duranensis lectin CPL (LOC107466721), mRNA	0,65	0,01	1,06	0,01	1,63	1,27597	-1,27309	1,26068	0	AT5G10530	concanavalin A-like lectin kin	37%
ASTER024734.138048	PREDICTED: Arachis duranensis alpha-methyl-mannoside-specific li	0,87	0,03	1,31	0,03	1,51	1,80829	1,03324	3,72241	0	AT5G10530	concanavalin A-like lectin kin	36%
ASTER003064.26023	PREDICTED: Arachis duranensis elongation factor 2 (LOC107464412),	0,93	0,01	1,03	0,01	1,11	-1,27987	-1,3599	-1,22324	0	LOS1	elongation factor EF-2	93%
ASTER009917.70162	PREDICTED: Arachis duranensis elongation factor 2 (LOC107476817),	0,91	0,03	1,06	0,02	1,16	-1,19153	-2,75794	-1,14161	0	LOS1	elongation factor EF-2	91%
ASTER009987.70565	PREDICTED: Arachis ipaensis elongation factor 1-alpha (LOC1076173	0,97	0,01	1,02	0,01	1,05	1,15734	1,10023	1,0904	0	AT1G07920	Elongation factor 1-alpha; Th	96%
ASTER014589.94456	PREDICTED: Arachis ipaensis elongation factor 1-gamma (LOC107613	0,95	0,02	1,04	0,02	1,09	-1,04299	-1,08158	-1,03167	0	AT1G09640	elongation factor EF-1 gamma	77%
ASTER022108.127560	PREDICTED: Arachis duranensis elongation factor 1-beta (LOC107496	0,96	0,02	1,04	0,02	1,08	1,19666	1,18856	1,18555	0	AT5G12110	Elongation factor 1-beta 1; El	77%
ASTER032836.166126	Chlorella pyrenoidosa EF-2 mRNA for elongation factor 2, partial cd:	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	-1,27987	-1,3599	-1,22324	0	LOS1	elongation factor EF-2	75%
ASTER099365.307649	Cunninghamella blakesleeana voucher CBS:133.27 translation elon	0,93	0,02	1,08	0,02	1,16	1,15734	1,10023	1,0904	0	AT1G07920	Elongation factor 1-alpha	76%

(Continua na próxima página)



ID do transcrito e categoria funcional ^a	Anotação NCBI	Perfil	Perfil CTR	Perfil	Perfil INOC	Fold change	Fold change	Transcritômico ^b			ID proteína (String) ^f	Anotação (String)	Identidade (String)
		CTR ^b	(DP) ^c	INOC ^b	(DP) ^c	Proteômico ^d	3DAI	6DAI	9DAI	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
ASTER012629.84673	PREDICTED: Arachis duranensis uncharacterized LOC107459025 (LOC107459025)	0,88	0,02	1,03	0,02	1,17	1,13013	1,03232	-1,07003	EIF4A-2	eif4a-2; ATP-dependent RNA	92%	
ASTER069626.256608	Chlorella variabilis eukaryotic initiation factor 4A (ATP-dependent f	0,99	0,11	0,94	0,06	-1,05	1,26503	1,21259	1,12856	EIF4A1	translational initiation factor 4	92%	
ASTER037477.180309	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein S15-4 (LOC107459025)	0,99	0,04	1,08	0,04	1,09	1,17736	1,08886	1,16087	AT5G09500	40S ribosomal protein S15-3	92%	
ASTER031806.162764	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein S18 (LOC107459025)	1,04	0,02	0,98	0,03	-1,06	1,17845	1,10431	1,1628	RPS18C	POINTED FIRST LEAVES	95%	
ASTER032748.165852	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein S19-1 (LOC107459025)	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,40543	1,21441	1,07058	AT3G02080	40S ribosomal protein S19-1	83%	
ASTER026029.142904	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein S3-3 (LOC107459025)	0,92	0,03	1,03	0,02	1,12	1,13124	1,06577	1,06816	AT5G35530	40S ribosomal protein S3-3	87%	
ASTER021861.126561	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein S4-1 (LOC107459025)	0,94	0,03	1,06	0,03	1,13	1,07826	1,00589	1,147	AT2G17360	40S ribosomal protein S4-3	92%	
ASTER093370.298134	Saitoella complicata NRRL Y-17804 putative 40S ribosomal protein S	1,03	0,05	0,89	0,05	-1,16	1,12667	1,05782	1,06466	RPS5B	Ribosomal protein 5B	90%	
ASTER020263.119992	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein S7 (LOC107459025)	0,83	0,04	1,13	0,04	1,36	1,30215	1,38588	1,33532	AT3G02560	40S ribosomal protein S7-2	79%	
ASTER072308.261806	Chlamydomonas reinhardtii strain CC1690 40S ribosomal protein S9	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,07594	-1,09512	-1,00651	AT5G39850	40S ribosomal protein S9-2	85%	
ASTER033532.168351	PREDICTED: Arachis duranensis 40S ribosomal protein SA-like (LOC107459025)	0,94	0,02	1,03	0,02	1,10	0	0	0	P40	40s ribosomal protein SA; Re	87%	
ASTER087059.287986	Volvox carteri f. nagariensis component of cytosolic 80S ribosome a	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	1,1732	1,09205	1,04394	AT2G37190	60S ribosomal protein L12-2;	82%	
ASTER039868.187316	PREDICTED: Arachis ipaensis probable 60S ribosomal protein L14 (L	0,96	0,04	1,05	0,05	1,09	1,29939	1,09701	1,12188	AT4G27090	60S ribosomal protein L14-2	82%	
ASTER034757.172146	PREDICTED: Arachis ipaensis 60S ribosomal protein L35 (LOC1076190)	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,29011	1,16337	1,16654	AT3G09500	60S ribosomal protein L35-1	86%	
ASTER015792.100316	PREDICTED: Arachis ipaensis 60S ribosomal protein L4 (LOC10764866)	0,99	0,02	1,03	0,02	1,04	-1,00838	-1,08563	1,05265	AT3G09630	60S ribosomal protein L4-1	82%	
ASTER029955.156568	PREDICTED: Arachis ipaensis 60S ribosomal protein L4 (LOC10762523)	0,97	0,03	1,03	0,03	1,06	-1,00838	-1,08563	1,05265	AT3G09630	60S ribosomal protein L4-1	84%	
ASTER022723.130062	PREDICTED: Arachis duranensis 60S ribosomal protein L5 (LOC107472)	0,98	0,03	0,98	0,03	1,00	1,03854	-1,10577	1,01431	RPL5A	ribosomal protein L5; Blinds t	84%	
ASTER031782.162667	PREDICTED: Arachis duranensis 60S ribosomal protein L9 (LOC107482)	0,97	0,03	1,09	0,04	1,12	1,03065	-1,08057	-1,02528	PGY2	PIGGYBACK2	86%	
ASTER017677.108785	PREDICTED: Arachis ipaensis 60S acidic ribosomal protein P0 (LOC107459025)	0,94	0,03	0,98	0,03	1,04	1,03213	-1,08178	1,02982	AT2G40010	60S acidic ribosomal protein	83%	
ASTER033582.168534	PREDICTED: Arachis duranensis 60S acidic ribosomal protein P1-1 (L	0,63	0,04	1,36	0,04	2,16	1,27702	1,13347	1,11409	AT5G24510	large subunit ribosomal prote	52%	
ASTER008554.62353	PREDICTED: Arachis duranensis probable mitochondrial-processing	0,87	0,02	1,07	0,03	1,23	1,06909	1,05286	1,04982	MPPBETA	mitochondrial processing pept	78%	
ASTER006778.51713	PREDICTED: Arachis ipaensis patellin-3 (LOC107629762), mRNA	0,77	0,02	1,17	0,03	1,52	1,22699	1,45904	1,11917	AT1G72160	patellin-3; Carrier protein tha	68%	
Fotossíntese (BIN 1)													
ASTER032896.166321	PREDICTED: Arachis duranensis fructose-bisphosphate aldolase 6, c	0,99	0,02	1	0,02	1,01	1,22314	1,15991	1,2009	FBA6	fructose-bisphosphate aldol	90%	
ASTER011831.80510	PREDICTED: Arachis duranensis phosphoglycerate kinase, chloropla	0,89	0,02	1,06	0,02	1,19	1,02126	1,09123	1,11992	AT1G56190	phosphoglycerate kinase	83%	
ASTER015229.97604	Chlorella variabilis hypothetical protein (CHLNCRAFT_48457) mRNA	0,85	0,06	1,14	0,05	1,34	1,02126	1,09123	-0,89292	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	71%	
ASTER016488.103513	PREDICTED: Arachis ipaensis phosphoglycerate kinase, cytosolic (L	0,88	0,01	1,05	0,01	1,19	1,02126	1,09123	1,11992	PGK	phosphoglycerate kinase	90%	
ASTER017066.106102	PREDICTED: Arachis duranensis probable ribose-5-phosphate isom	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,33616	1,43941	1,32757	EMB3119	EMBRYO DEFECTIVE 3119	72%	
ASTER004400.36091	PREDICTED: Arachis duranensis transketolase, chloroplastic (LOC107459025)	0,97	0,02	1,03	0,02	1,06	1,21658	1,11854	1,06927	AT2G45290	Transketolase; Catalyzes the	81%	
ASTER032025.163431	PREDICTED: Arachis ipaensis glycine cleavage system H protein 2, m	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,69113	1,76239	1,5866	AT2G35120	glycine cleavage system H p	79%	
ASTER023038.131337	PREDICTED: Arachis duranensis hydroxyphenylpyruvate reductase (L	1,03	0,05	1,05	0,04	1,02	1,28769	1,35931	1,29201	AT1G79870	putative D-isomer specific 2-	71%	
Redox (BIN 21)													
ASTER006430.49568	PREDICTED: Arachis duranensis monodehydroascorbate reductase 5	1,01	0,03	1,01	0,03	1,00	1,03075	-1,1602	1,1114	MDAR6	Monodehydroascorbate red	78%	
ASTER012911.86125	PREDICTED: Arachis duranensis monodehydroascorbate reductase (0,88	0,01	1,13	0,01	1,28	1,13772	1,07431	1,19977	MDAR1	monodehydroascorbate red	73%	
ASTER019134.115275	PREDICTED: Arachis ipaensis L-ascorbate peroxidase, cytosolic (L	0,88	0,01	1,14	0,01	1,30	1,28697	1,1067	1,3791	APX1	L-ascorbate peroxidase; Pla	82%	
ASTER021577.125412	PREDICTED: Arachis ipaensis L-ascorbate peroxidase, cytosolic (L	0,87	0,01	1,14	0,01	1,31	1,28697	1,1067	1,3791	APX1	L-ascorbate peroxidase; Pla	82%	
ASTER036403.177128	PREDICTED: Arachis duranensis monodehydroascorbate reductase (0,88	0,02	1,12	0,02	1,27	1,13772	1,07431	1,19977	ATMDAR2	MONOdehydroascorbate red	68%	
ASTER008922.64543	PREDICTED: Arachis duranensis catalase (LOC107460209), mRNA	0,9	0,01	1,13	0,01	1,26	-1,22734	-1,06458	-1,34606	CAT	catalase 2; Occurs in almost	82%	
ASTER024186.135859	PREDICTED: Arachis duranensis peroxiredoxin-2B (LOC107490289), ml	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	1,23907	1,19774	1,20208	PRXIIC	peroxiredoxin-2B; Reduces f	74%	
ASTER026626.145002	PREDICTED: Arachis duranensis peroxiredoxin-2B (LOC107490289), ml	0,99	0,01	1,02	0,01	1,03	1,23907	1,19774	1,20208	TPX1	peroxiredoxin-2B; Reduces f	77%	
ASTER029116.153710	PREDICTED: Arachis duranensis peroxiredoxin-2F, mitochondrial (L	0,9	0,03	1,14	0,03	1,27	1,61121	1,50817	1,44381	PRXIIF	peroxiredoxin-2F; Reduces f	75%	
ASTER007758.57700	PREDICTED: Arachis duranensis protein disulfide isomerase-like 1-	0,95	0,05	1,02	0,06	1,07	1,0557	1,08916	-1,00431	PDIL1-4	PDI-like 1-4; Acts as a protei	71%	
ASTER013803.90537	PREDICTED: Arachis duranensis protein disulfide isomerase-like 2-	0,99	0,05	1,1	0,06	1,11	1,14243	-1,01114	1,00809	PDIL2-2	PDI-like 2-2; Acts as a protei	74%	
RNA (BIN 27)													
ASTER037905.181533	PREDICTED: Arachis duranensis nuclear poly(A) polymerase 4 (LOC107459025)	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	-1,58981	-1,55323	-1,2897	nPAP	nuclear poly(a) polymerase	70%	
Metabolismo secundário (BIN 16)													
ASTER027425.147893	PREDICTED: Arachis duranensis chalcone--flavonone isomerase 1B-	0,97	0,02	1,07	0,02	1,10	1,18291	1,28359	1,10671	TT5	TRANSPARENT TESTA 5; Ca	49%	
ASTER011179.77096	PREDICTED: Arachis duranensis hydroquinone glucosyltransferase (0,91	0,02	1,14	0,02	1,25	-1,93327	-2,41239	-1,64884	GT72B1	hydroquinone glucosyltransf	46%	
ASTER018574.112751	PREDICTED: Arachis duranensis isoflavone reductase-like protein (L	1,01	0,02	1,01	0,02	1,00	1,26931	1,49794	1,23221	AT1G75290	isoflavone reductase-like prc	66%	

(Continua na próxima página)



ID do transcrito e categoria funcional ^a	Anotação NCBI	Perfil	Perfil CTR	Perfil	Perfil INOC	Fold change	Fold change	- Transcritômico ^b			ID proteína (String) ^f	Anotação (String)	Identidade (String)
		CTR ^b	(DP) ^c	INOC ^b	(DP) ^c	Proteômico ^d	3DAI	6DAI	9DAI	<i>Arabidopsis thaliana</i>			
ASTER018788.113692	PREDICTED: Arachis duranensis isoflavone reductase-like protein (L	0,92	0,04	1,06	0,03	1,15	-1,02673	1,02957	-1,00345	AT4G39230	NmrA-like negative transcript	68%	
Sinalização (BIN 30)													
ASTER016405.103140	PREDICTED: Arachis duranensis 14-3-3-like protein A (LOC107486875)	0,86	0,02	1,15	0,02	1,34	-1,03356	-1,01756	-1,0079	At3g02520	14-3-3-like protein GF14 nu;	89%	
ASTER016430.103268	PREDICTED: Arachis ipaensis 14-3-3-like protein C (LOC107622960), m	0,88	0,02	1,15	0,02	1,31	1,16376	1,14386	1,06597	AT2G42590	14-3-3-like protein GF14 mu;	77%	
ASTER018473.112342	PREDICTED: Arachis duranensis 14-3-3-like protein D (LOC107462430)	0,86	0,02	1,14	0,02	1,33	-1,01767	-1,06733	1,01789	AT2G42590	14-3-3-like protein GF14 mu;	83%	
ASTER020432.120727	PREDICTED: Arachis duranensis 14-3-3-like protein (LOC107460876), r	0,91	0,02	1,12	0,02	1,23	1,33922	1,37197	1,39799	GF14	general regulatory factor 2; l	91%	
ASTER029287.154326	PREDICTED: Arachis duranensis 14-3-3-like protein A (LOC107486875)	1,02	0,03	0,69	0,03	-1,48	-1,03356	-1,01756	-1,0079	At3g02520	14-3-3-like protein GF14 nu;	89%	
ASTER012293.82969	PREDICTED: Arachis ipaensis guanosine nucleotide diphosphate di	0,9	0,03	1,12	0,04	1,24	1,05905	1,0188	1,02268	GD11	guanosine nucleotide diphos	86%	
ASTER019999.118933	PREDICTED: Arachis ipaensis agglutinin-2 (LOC107618002), mRNA	0,77	0,01	1,11	0,01	1,44	1,78039	2,25558	1,8568	AT5G10530	concanavalin A-like lectin kin	30%	
ASTER023817.134420	PREDICTED: Arachis duranensis mannose-specific lectin CML-2 (LOC:	0,41	0,01	1,54	0,04	3,76	1,80829	1,03324	3,72241	AT5G10530	concanavalin A-like lectin kin	35%	
ASTER025310.140262	PREDICTED: Arachis ipaensis mannose-specific lectin alpha chain (l	1,37	0,01	0,81	0,01	-1,69	1,48026	1,91977	-1,84643	AT5G10530	concanavalin A-like lectin kin	37%	
ASTER029099.153657	PREDICTED: Arachis duranensis lectin alpha chain (LOC107459247), n	1,03	0,02	0,9	0,02	-1,14	1,27597	-1,27309	1,26068	AT5G10530	concanavalin A-like lectin kin	34%	
ASTER032727.165793	PREDICTED: Arachis duranensis lectin CPL (LOC107459218), mRNA	1,12	0,04	0,92	0,04	-1,22	1,27597	-1,27309	1,26068	AT5G10530	concanavalin A-like lectin kin	34%	
Estresse (BIN 20)													
ASTER025953.142635	PREDICTED: Arachis ipaensis thaumatin-like protein 1 (LOC10764306)	0,8	0,04	1,04	0,04	1,30	2,75628	3,31384	1,88793	OSM34	osmotin 34	67%	
ASTER011211.77254	PREDICTED: Arachis duranensis peroxidase 39 (LOC107477749), mRNA	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	2,71377	3,27115	2,12309	AT4G11290	peroxidase 39; Removal of H	60%	
ASTER016303.102672	PREDICTED: Arachis ipaensis peroxidase 3 (LOC107613819), mRNA	0,98	0,03	1,05	0,04	1,07	1,40476	1,42535	1,26321	RCI3	peroxidase 3; Removal of H ₂	67%	
ASTER004274.35187	PREDICTED: Arachis duranensis luminal-binding protein (LOC107479	0,92	0,02	1,08	0,01	1,17	1,15667	-1,09	1,05418	BIP2	Luminal-binding protein 2; Co	92%	
ASTER005123.41003	PREDICTED: Arachis duranensis heat shock cognate protein 80 (LOC1	0,89	0,01	1,06	0,01	1,19	-1,04103	-1,54458	1,03235	Hsp81.4	HEAT SHOCK PROTEIN 81.4;	92%	
ASTER005271.42005	PREDICTED: Arachis duranensis probable mediator of RNA polymera	0,93	0,01	1,03	0,01	1,11	1,05569	1,06961	1,16655	HSP70	heat shock protein 70; Comp	92%	
ASTER006109.47535	PREDICTED: Arachis duranensis heat shock protein 83 (LOC10749110)	0,88	0,02	1,14	0,03	1,30	-1,22132	-2,50433	1,46597	HSP90.1	heat shock protein 81-1; Mol	90%	
ASTER014460.93815	PREDICTED: Arachis duranensis probable mediator of RNA polymera	0,94	0,01	1,03	0,02	1,10	1,09932	-1,54159	1,01901	HSC70-1	heat shock 70kDa protein 1/E	95%	
ASTER038058.181983	PREDICTED: Arachis duranensis heat shock cognate 70 kDa protein 2	0,88	0,02	1,1	0,03	1,25	1,37742	-1,30888	1,35822	HSP70-18	EARLY-RESPONSIVE TO DEI	93%	
ASTER092969.297513	PREDICTED: Arachis ipaensis chaperone protein ClpB3, chloroplast	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	1,85591	-1,0712	0	CLPB3	Casein lytic proteinase B3; M	75%	
ASTER027112.146755	PREDICTED: Arachis ipaensis germin-like protein subfamily 1 memb	0,94	0,03	1,06	0,03	1,13	1,27071	1,32468	1,25764	AT3G05950	germin-like protein subfamily	68%	
ASTER033257.167465	PREDICTED: Arachis duranensis MLP-like protein 34 (LOC107462779),	0,89	0,01	1,2	0,01	1,35	1,13576	-1,1409	1,12045	MLP	SRPBCC ligand-binding doma	40%	
ASTER036020.175986	PREDICTED: Arachis duranensis MLP-like protein 34 (LOC107496959),	0,51	0,05	1,3	0,04	2,55	-1,13109	-1,44522	1,03041	AT5G28010	SRPBCC ligand-binding doma	35%	
ASTER037104.179204	PREDICTED: Arachis duranensis MLP-like protein 34 (LOC107462808),	0,9	0,02	1,24	0,02	1,38	1,0022	-1,27034	-1,03079	MLP	SRPBCC ligand-binding doma	35%	
ASTER024509.137128	PREDICTED: Arachis duranensis endochitinase (LOC107477929), tran:	0,89	0,04	1,12	0,08	1,26	-1,16561	2,57274	1,06462	HCHIB	chitinase; Defense against c	72%	
TCA/Transformação org (BIN 8)													
ASTER011504.78807	PREDICTED: Arachis duranensis malate dehydrogenase, chloroplast	0,94	0,03	0,98	0,03	1,04	1,28351	1,10689	-1,01134	MDH	malate dehydrogenase	75%	
ASTER015247.97684	PREDICTED: Arachis duranensis malate dehydrogenase (LOC1074661)	0,92	0,01	1,08	0,01	1,17	1,23968	1,14549	1,20603	c-NAD-MDH1	malate dehydrogenase	90%	
ASTER035280.173755	PREDICTED: Arachis ipaensis NADP-dependent malic enzyme (LOC10	0,95	0,03	0,91	0,04	-1,04	-1,06435	-1,0637	-1,00956	NADP-ME3	NADP-malic enzyme 3	75%	
ASTER044487.199872	PREDICTED: Arachis ipaensis NADP-dependent malic enzyme (LOC10	0,92	0,03	1,1	0,03	1,20	1,35037	1,78464	1,10819	NADP-ME4	NADP-malic enzyme 4; The c	78%	
ASTER008394.61452	PREDICTED: Arachis ipaensis succinate-semialdehyde dehydrogena	0,94	0,03	1,08	0,04	1,15	1,06533	1,03812	1,10051	ALDH5F1	aldehyde dehydrogenase 5F	80%	
ASTER001765.15580	PREDICTED: Arachis duranensis aconitase hydratase, cytoplasmic (L	0,85	0,02	1,07	0,02	1,26	-1,29709	-1,41043	-1,26944	ACO3	aconitase 3; Catalyzes the is	88%	
ASTER002086.18371	PREDICTED: Arachis duranensis aconitase hydratase, cytoplasmic (L	0,85	0,02	1,06	0,02	1,25	1,01629	-1,02625	1,0202	ACO3	aconitase 3; Catalyzes the is	88%	
ASTER002503.21599	PREDICTED: Arachis duranensis aconitase hydratase 1 (LOC10748744)	0,84	0,02	1,1	0,02	1,31	-1,02148	1,10488	-1,04553	ACO	aconitase 1; Catalyzes the is	88%	
ASTER012499.84016	PREDICTED: Arachis duranensis isocitrate dehydrogenase [NADP] (L	0,96	0,02	1,01	0,02	1,05	1,22374	1,43301	1,20013	ciCDH	isocitrate dehydrogenase; M	89%	
ASTER013212.87626	PREDICTED: Arachis ipaensis malate dehydrogenase, mitochondrial	0,95	0,02	1	0,01	1,05	1,09528	1,11559	1,12394	mMDH1	malate dehydrogenase 1	82%	
ASTER010044.70880	PREDICTED: Arachis duranensis dihydrolipoyl dehydrogenase, mitoc	0,94	0,03	1,06	0,03	1,13	1,17802	1,1065	1,12499	mtLPD1	dihydrolipoyl dehydrogenase	86%	
Transporte (BIN 34)													
ASTER007150.54001	PREDICTED: Arachis duranensis probable aquaporin PIP-type 7a (LO	0,79	0,03	1,06	0,04	1,34	1,02625	-1,24997	1,19846	PIP1;4	putative aquaporin PIP1-4; W	85%	
ASTER017085.106192	PREDICTED: Arachis duranensis aquaporin PIP2-7 (LOC107461713), ml	0,92	0,08	1,05	0,1	1,14	-1,03533	-1,22511	1,26546	PIP2-4	putative aquaporin PIP2-4; A	77%	
ASTER017667.108751	PREDICTED: Arachis duranensis aquaporin PIP2-7 (LOC107476957), ml	0,83	0,04	1,08	0,06	1,30	-1,0435	-1,36296	1,05094	PIP2B	aquaporin PIP2-2; Water cha	77%	
ASTER021134.123619	PREDICTED: Arachis duranensis probable aquaporin TIP-type (LOC10	0,76	0,21	0,99	0,1	1,30	1,75888	1,64747	1,74366	GAMMA-TIP	aquaporin TIP1-1; Water cha	81%	
ASTER009189.66001	PREDICTED: Arachis duranensis mitochondrial phosphate carrier prx	0,91	0,03	1,06	0,03	1,16	1,33164	1,33207	1,21089	PHT3;1	phosphate transporter 3;1; T	79%	
ASTER000796.6896	PREDICTED: Arachis duranensis ATPase 11, plasma membrane-type	0,89	0,04	0,95	0,03	1,07	-1,16825	-1,30363	-1,33618	HA11	H(+)-ATPase 11; The plasma	95%	
ASTER005253.41870	PREDICTED: Arachis duranensis V-type proton ATPase catalytic subu	0,85	0,02	1,08	0,02	1,27	-1,02087	-1,13808	1,07336	VHA-A	vacuolar ATP synthase subu	93%	

(Continua na próxima página)



ID do transcrito e categoria funcional ^a	Anotação NCBI	Perfil	Perfil CTR	Perfil	Perfil INOC	Fold change Proteômico ^d	Fold change - Transcritômico ^e			ID proteína (String) ^f <i>Arabidopsis thaliana</i>	Anotação (String) <i>Arabidopsis thaliana</i>	Identidade (String) <i>Arabidopsis thaliana</i>
		CTR ^b	(DP) ^c	INOC ^b	(DP) ^c		3DAI	6DAI	9DAI			
ASTER008394.61452	PREDICTED: Arachis ipaensis succinate-semialdehyde dehydrogenase	0,94	0,03	1,08	0,04	1,15	1,06533	1,03812	1,10051	ALDH5F1	aldehyde dehydrogenase 5F	80%
ASTER001765.15580	PREDICTED: Arachis duranensis aconitate hydratase, cytoplasmic (L	0,85	0,02	1,07	0,02	1,26	-1,29709	-1,41043	-1,26944	ACO3	aconitase 3; Catalyzes the is	88%
ASTER002086.18371	PREDICTED: Arachis duranensis aconitate hydratase, cytoplasmic (L	0,85	0,02	1,06	0,02	1,25	1,01629	-1,02625	1,0202	ACO3	aconitase 3; Catalyzes the is	88%
ASTER002503.21599	PREDICTED: Arachis duranensis aconitate hydratase 1 (LOC10748744)	0,84	0,02	1,1	0,02	1,31	-1,02148	1,10488	-1,04553	ACO	aconitase 1; Catalyzes the is	88%
ASTER012499.84016	PREDICTED: Arachis duranensis isocitrate dehydrogenase [NADP] (L	0,96	0,02	1,01	0,02	1,05	1,22374	1,43301	1,20013	ciCDH	isocitrate dehydrogenase; M	89%
ASTER013212.87626	PREDICTED: Arachis ipaensis malate dehydrogenase, mitochondrial	0,95	0,02	1	0,01	1,05	1,09528	1,11559	1,12394	mMDH1	malate dehydrogenase 1	82%
ASTER010044.70880	PREDICTED: Arachis duranensis dihydrolipoyl dehydrogenase, mitoc	0,94	0,03	1,06	0,03	1,13	1,17802	1,1065	1,12499	mtLPD1	dihydrolipoyl dehydrogenase	86%
Transporte (BIN 34)												
ASTER007150.54001	PREDICTED: Arachis duranensis probable aquaporin PIP-type 7a (LO	0,79	0,03	1,06	0,04	1,34	1,02625	-1,24997	1,19846	PIP1;4	putative aquaporin PIP1-4; W	85%
ASTER017085.106192	PREDICTED: Arachis duranensis aquaporin PIP2-7 (LOC107461713), ml	0,92	0,08	1,05	0,1	1,14	-1,03533	-1,22511	1,26546	PIP2;4	putative aquaporin PIP2-4; A	77%
ASTER017667.108751	PREDICTED: Arachis duranensis aquaporin PIP2-7 (LOC107476957), ml	0,83	0,04	1,08	0,06	1,30	-1,0435	-1,36296	1,05094	PIP2B	aquaporin PIP2-2; Water cha	77%
ASTER021134.123619	PREDICTED: Arachis duranensis probable aquaporin TIP-type (LOC10	0,76	0,21	0,99	0,1	1,30	1,75888	1,64747	1,74366	GAMMA-TIP	aquaporin TIP1-1; Water cha	81%
ASTER009189.66001	PREDICTED: Arachis duranensis mitochondrial phosphate carrier pro	0,91	0,03	1,06	0,03	1,16	1,33164	1,33207	1,21089	PHT3;1	phosphate transporter 3;1; T	79%
ASTER000796.6896	PREDICTED: Arachis duranensis ATPase 11, plasma membrane-type	0,89	0,04	0,95	0,03	1,07	-1,16825	-1,30363	-1,33618	HA11	H(+)-ATPase 11; The plasma	95%
ASTER005253.41870	PREDICTED: Arachis duranensis V-type proton ATPase catalytic subu	0,85	0,02	1,08	0,02	1,27	-1,02087	-1,13808	1,07336	VHA-A	vacuolar ATP synthase subu	93%
ASTER001694.15093	PREDICTED: Arachis duranensis plasma membrane ATPase 4 (LOC10	0,87	0,01	0,99	0,02	1,14	-1,13817	-1,53102	-1,20082	HA1	H(+)-ATPase 1; The plasma	87%
ASTER032942.166480	PREDICTED: Arachis ipaensis V-type proton ATPase subunit B2 (LOC1	0,9	0,04	1,06	0,04	1,18	1,09689	1,04377	1,01287	VAB2	V-ATPase B subunit 2; Non-i	92%
ASTER020899.122654	PREDICTED: Arachis duranensis mitochondrial outer membrane prot	0,91	0,02	1,02	0,02	1,12	1,16484	1,07918	1,02997	VDAC1	voltage dependent anion cha	70%
ASTER022448.128965	PREDICTED: Arachis duranensis outer plastidial membrane protein	0,9	0,03	1,04	0,03	1,16	1,19382	1,18101	1,27895	VDAC1	voltage dependent anion cha	71%
ASTER013336.88264	PREDICTED: Arachis duranensis probable voltage-gated potassium c	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	KAB1	potassium channel beta subu	89%
ASTER009905.70098	PREDICTED: Arachis duranensis ADP/ATP carrier protein 1, mitochonc	1,01	0,02	0,99	0,02	-1,02	1,4955	1,43809	1,3713	AAC2	ADP/ATP carrier 2; Catalyze	82%

^aIdentificação do transcrito associado a proteína detectada em 2D-NanoUPLC-MS^E no banco de dados de transcrito de espécies silvestres de Arachis da Embrapa CENARGEN.

^bPerfil de abundância proteica das proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E em amostras CTR e inoculadas INOC.

^cDesvio padrão do perfil de abundância proteica das proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E em amostras controle (CTR - 0 DAI) e inoculadas (INOC - junção das amostras 3, 6 e 9 DAI). DAI - dias após a inoculação.

^dFold change baseado na razão entre a abundância proteica detectada em amostras INOC e amostras CTR por meio do 2D-NanoUPLC-MS^E

^eFold change baseado na razão entre a expressão gênica detectada, *in silico* (RNA-Seq), entre amostras dos pontos 3, 6 e 9 DAI e amostras CTR.

^fIdentificação das proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) identificadas no 2D-NanoUPLC-MS^E contra o banco de dados de *Arabidopsis thaliana* para análise de interação proteína-proteína (String).

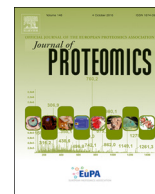
DAI - dias após a inoculação do nematoide.

CTR - amostras controle (0 DAI); INOC - amostras inoculadas dos pontos 3, 6 e 9 DAI de infecção, juntas.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Comparative proteomics and gene expression analysis in *Arachis duranensis* reveal stress response proteins associated to drought tolerance

Lílian S.T. Carmo^{a,1}, Andressa C.Q. Martins^{a,b,1}, Cinthia C.C. Martins^a, Mário A.S. Passos^a, Luciano P. Silva^a, Ana C.G. Araujo^a, Ana C.M. Brasileiro^a, Robert N.G. Miller^b, Patrícia M. Guimarães^a, Angela Mehta^{a,*}

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Arachis duranensis
Drought tolerance
Proteomic profile
Transcript expression
qRT-PCR

ABSTRACT

Peanut wild relatives (*Arachis* spp.) have high genetic diversity and are important sources of resistance to biotic and abiotic stresses. In this study, proteins were analyzed in root tissues of *A. duranensis* submitted to a progressive water deficit in soil and the differential abundance was compared to transcript expression profiles obtained by RNA-seq and qRT-PCR. Using a 2-DE approach, a total of 31 proteins were identified, most of which were associated with stress response and drought perception. These comprised a chitinase-2 (unique to stressed condition), an MLP-like protein, a glycine-rich protein DOT1-like, a maturase K and heat shock-related proteins (HSP70 – an isoform unique to the control, and HSP17.3). Other proteins unique to the control condition comprised a transcription initiation factor IIF subunit alpha-like protein, a SRPBCC ligand-binding domain superfamily protein, an Adenine phosphoribosyl transferase, a Leo1-like protein, a Cobalamine-independent methionine synthase and a Transmembrane emp24 domain-containing protein p24delta9-like. Correlation of mRNA expression and corresponding protein abundance was observed for 15 of the identified proteins, with genes encoding the majority of proteins (14) negatively regulated in stressed roots. Proteins identified in this study offer potential for the genetic improvement of cultivated peanut for drought tolerance.

Significance: The comparison of protein abundance and corresponding transcript expression levels (RNA-seq and qRT-PCR) revealed that 15 of the identified proteins showed similar expression behavior, with the majority (14 proteins) negatively regulated in stressed roots. Chitinase-2 (Cht2) was the only protein with an upregulation behavior in all approaches. These proteins appear to play an important role in drought tolerance in *A. duranensis* and may be further explored in peanut genetic breeding programs.

1. Introduction

Cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.), which has a high oil and protein content, is an important nutritional seed that can be consumed *in natura*. *A. hypogaea* is grown mainly in Asia, Africa and the Americas and represents the fourth most-produced oilseed crop globally, after soybean, rapeseed and sunflower. Most peanut production currently occurs in drought-prone regions, where growth and yield can be severely affected by water scarcity [1–3]. The need for development of drought-tolerant cultivars for improved crop productivity and resilience under limited water availability is currently a major challenge in global agriculture. For this, an increased understanding of the mechanisms controlling abiotic stress responses, including physiological,

biochemical, and gene regulatory networks, is fundamental [4–6].

In order to withstand water deficiency, plants have developed complex mechanisms to escape, adapt and survive under drought stress, which involve morphological, physiological, biochemical and molecular responses [7]. As cellular processes are also regulated by post-translational modifications, as well as protein-protein interactions and enzymatic activities, gene expression analysis should be complemented by additional approaches [8]. For this reason, proteomic and metabolomic studies are being increasingly performed, either separately or in combination, to better understand stress response and tolerance mechanisms [9,10]. In peanut, previous investigations into the proteome profiles of tolerant and sensitive genotypes under drought stress have mainly focused on leaf tissues [8,11,12]. Roots, however, are a primary

* Corresponding author at: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI, Av. W/5 Norte Final, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brazil

E-mail address: angela.mehta@embrapa.br (A. Mehta).

¹ These authors contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.011>

Received 1 June 2018; Received in revised form 10 September 2018; Accepted 20 September 2018

1874-3919/© 2018 Published by Elsevier B.V.

perception site of soil water deficit, triggering a variety of defense mechanisms against this stress condition [13]. Responses are typically rapid, to minimize the damaging effects of reduction in water availability [13,14].

Unlike cultivated peanut, which has a narrow genetic base and is sensitive to extended dry conditions, wild relatives are more genetically diverse and present a higher tolerance to drought [15–17]. In previous studies performed by our group, we showed that cultivated and wild *Arachis* species display contrasting transpiration patterns in response to water-limited conditions [18–20]; *A. duranensis* exhibited a more conservative transpiration behavior for water usage, and has been used as a rich resource for drought tolerance-related gene discovery.

Considering that the molecular mechanisms of drought tolerance are complex, and that the modulation of gene expression can lead to modification in the abundance of proteins involved in response to this stress, it is important to analyze molecular changes at different omic levels. Complementing the reference genomic sequence for this diploid species [21], associated with the root transcriptome under drought stress (air drying) [20], here, the abundance of proteins in roots of *A. duranensis* plants submitted to a gradual water deficit in soil was analyzed using a 2-DE approach. Proteomic data was compared to our previous transcriptomic data (RNA-seq), and further validated by qRT-PCR analysis. The candidate genes identified for differentially abundant proteins offer potential for the genetic improvement of cultivated peanut for drought tolerance.

2. Experimental procedures

2.1. Plant growth and treatments

A. duranensis seeds (accession K7988) were obtained from the Embrapa Active Germplasm Bank (Brazil). A greenhouse-based dry-down experiment with a gradual decrease of soil moisture was carried out as previously described [15,19], using one-month-old plants grown in 500 mL pots containing sterile soil (one plant per pot). Plants were divided into two groups: a well-watered control and a stressed group, with each group comprising three plants per biological replicate. A total of three biological replicates were analyzed. The dry-down experiment consisted of an interruption in irrigation of plants from the stressed group after soil reached 70% field capacity (FC). The transpiration rate (TR) of each plant was estimated gravimetrically and normalized (NTR) individually, based on the ratio between the TR value and the mean TR value of the control plants for each analyzed time point, as described by Muchow and Sinclair [22]. *A. duranensis* root tissues from the control and stressed groups were collected at the fourth day, based on an NTR value of approximately 0.2, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

2.2. Evaluation of chlorophyll content, electrolyte leakage and relative water content

Leaf chlorophyll content was estimated in plants submitted to dry-down since it is one of the main indices reflecting responsiveness to drought conditions [23]. Chlorophyll content was assessed based upon soil plant analysis development (SPAD) chlorophyll meter readings (SCMR) (SPAD-502, Minolta Sensing), as described in Leal-Bertioli et al. [15]. During the dry-down assay, two SCMRs were recorded daily from the same leaflet of the second fully expanded leaf of the main stem of each control and stressed plant. At the end of the experiment, when the plants reached an NTR value of approximately 0.2, leaflets employed for SCMR were harvested and the concentration of photosynthetic pigments determined according to Yang et al. [24].

Three leaf discs (0.4 cm^2) of each plant (control and stressed) were also collected and analyzed for electrolyte leakage (EL) and relative water content (RWC), according to Brito et al. [25].

2.3. Protein extraction and 2-DE analysis

Total proteins were extracted from root samples of stressed and control plants collected at the end of the dry-down assay (fourth day). Each sample comprised three plants, pooled together to form one biological replicate. Proteins were extracted from a total of three biological replicates using phenol, followed by precipitation with ammonium acetate in methanol, as described by Carmo et al. [26]. Total proteins were suspended in solubilization buffer [7 M urea; 1 M thiourea; 4% (w/v) CHAPS; 2% (v/v) IPG buffer pH 4–7; 40 mM dithiothreitol] and quantified using the Bradford Reagent (BioRad). Approximately $600\text{ }\mu\text{g}$ of proteins were loaded onto 13 cm Immobiline™ DryStrips, pH 4–7 (GE Healthcare) then submitted to isoelectric focusing using an Ettan™ IPGphor™ 3 Isoelectric Focusing System (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Gel strips were equilibrated for 15 min in equilibration buffer [1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 6 M urea; 30% (v/v) glycerol; 2% (w/v) SDS; 1% (v/v) bromophenol blue] containing 1 M DTT, then for an additional 15 min in the same equilibration buffer with 2.5% iodoacetamide. The second dimension was performed using 12% polyacrylamide gels with inclusion of a molecular mass marker Benchmark Protein Ladder (Invitrogen), as previously described [26]. Proteins were stained with a solution of Coomassie Blue G-250 [10% (w/v) ammonium sulphate; 0.1% (w/v) Coomassie G-250; 20% (v/v) methanol and 2% (v/v) phosphoric acid].

2.4. Gel image analysis and protein identification

Three gels, one per biological replicate, were scanned with an ImageScannerIII (GE Healthcare) and images analyzed using the program Image Master 2D Platinum, version 7.05 (GE Healthcare). Spots were detected automatically then improved by manual editing to eliminate technical artifacts. Spots were considered differentially abundant based on ANOVA (p -value $\leq .05$) following image analysis. Differential protein spots were excised from gels and digested with trypsin (Sigma-Aldrich®), according to the manufacturer's instructions. Tryptic peptides were applied onto a MALDI target plate and analyzed in an Auto-Flex Speed MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics) mass spectrometer, operated in positive reflector (MS) and LIFT™ (MS/MS) modes. Proteins were identified using the MASCOT search engine Matrix Science with the NCBIprot database and Viridiplantae taxonomy. For analysis by Peptide Mass Fingerprinting (PMF), carbamidomethylation of cysteine was considered as a fixed modification and oxidation of methionine as a variable modification. A tolerance of 150 ppm and loss of one cleavage site were permitted in the analyses. The same parameters were employed for MS/MS analysis, with the addition of a mass tolerance of 0.6 Da ion fragments and charge state of +1. Only significant identifications (p -value $\leq .05$) were accepted.

2.5. qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted from the same samples used for protein analysis (roots of stressed and control plants collected at the end of the dry-down assay), with cDNA synthesized according to the protocol described by [27]. Nucleotide sequences for transcripts putatively encoding proteins identified by MASCOT were determined using the tBLASTn algorithm and the *A. duranensis* CDS (coding DNA sequence) database available at Peanut Base (<http://peanutbase.org/>) and NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). For each candidate gene, specific primers were designed using the software Primer3 Plus, following the parameters described by [27] (Table 1). qRT-PCR reactions were performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR cycler (Applied Biosystems) using a Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG w/ ROX Kit (Invitrogen, USA). Three independent biological replicates were analyzed, with three technical replicates included for each reaction. Optimal cycle quantification (Cq) values and primer efficiency were estimated using the Real-time PCR Miner algorithm [28]. The mean Cq

Table 1
Primers designed for the genes encoding the identified proteins.

Protein spot	Gene	Forward primers (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Amplicon (bp)	Primer efficiency
033	<i>EaseIII</i>	TTTCGGTTACACCTCGATCC	AGAGTGGTTTTGGGCTCTT	187	0.89
041	<i>NDPK-1</i>	TCAGGTCCGTGTTGTGTCAT	AGCTATTTCCCGCTTTCCAT	170	0.87
047	<i>DOT-1</i>	CAGGATATGAAGCCGAAAA	GAAGAACAGTGACAGACGCG	167	0.82
052	<i>MLP-43</i>	TTGGTTCTGTCAAGCACTGG	ACAATTCACACCACCTTCC	190	0.88
087	<i>POZ</i>	GAAGTACGTGGCCTCGGATA	TCCCCTCTGTATCCAAAAGG	179	0.88
088	<i>CHI-2</i>	GGGCCTTAGTTTCTCCCAAG	GTTGCAAAAACGGCAGGTAAT	164	0.85
101	<i>APX</i>	TGGTCACACTCTGGAGCTG	TCAACAAGAGGGCGGAATAC	183	0.86
104	<i>MSL</i>	AACCTAGCAACCTCGCAAGA	ACAAGGCTCTCCAACACTG	160	0.82
105	<i>ManGlcBl</i>	TCTTGCAAGGTGATGCAAAAG	CGACTTGATGACGAAGCTGA	185	0.85
122	<i>PSMA6</i>	AGTTGCCATGGTTTTGGGTA	CCGGATTCTCTTTTTGGACA	173	0.81
147	<i>ANX</i>	ATCTTGGGTCATCGAAATGC	CCATCTTTTGGTTGCTTCGT	189	0.84
158	<i>GSS6</i>	TGAAATGGCCTCTAGGTTGG	CCCCTGTCCAGGCATAACT	180	0.86
178	<i>SAM</i>	TCCCAGAGCCACTCTCTGTT	ACGTCCGAAATGTCGTAAG	185	0.85
184	<i>ENO</i>	CATTGGAATGGATGTTGCTG	GTGCTCCCAATCATCTTGGT	193	0.84
196	<i>ATPase</i>	GGACGTATCCCCTCTGCTGT	TGTTAGCAGGAGCAGGATCT	157	0.83
220/360	<i>HS70^a</i>	TGTGCTGCTTACTTCAACG	CTCAAGCACCAGACATCAA	193	0.85
224	<i>HypP</i>	AAGCCGTTGATCATCTTTG	CAGCCTGTGCAATTTCTTCA	183	0.86
246	<i>MDH</i>	CCCCGCTTGTCTTGATTTA	GCCGGGATAACAACAACATC	160	0.86
252	<i>MatK</i>	GGTTCCTTTTGAGCGAATC	CGCATTCTTTGAAGCCAGA	155	0.88
257/266	<i>MLP-34^a</i>	CAGCGTTGGTGGTTCTGTTA	ACAGTGGCACCTCCATTCTC	198	0.83
258	<i>HS17.3</i>	TTCTGCGTTCGTCACACTC	CCAGGTGTCGTTCTTGTCCT	175	0.87
270	<i>SHMT4</i>	GGCGGGTATGATCTTCTTCA	CCCAGGTGACATAGCCTGTT	181	0.86
291	<i>Ch2</i>	GCCTATGGCTTACACCTA	CCCATTCAAATTCATCTGG	173	0.84
327	<i>III^b</i>	AATTCAGGAAGGCAAACCTG	GAAAGTCTTCCCATCCATCG	151	–
332	<i>SRPBC</i>	TGAGGACTGGCAAAGATC	TGCATGGTGAGCTTCAAGAC	178	0.89
335	<i>APRT-4</i>	TGAGGTGTGAAGCAAGAG	TAAGGCTCGATCTCCAGT	190	0.87
348	<i>Leo-1</i>	TCAGAAATCCTGATGGACA	CCTTCCATGTCTGAGGAAA	159	0.88
361	<i>MetE</i>	TCACCTCCTGCTCACTCT	AGAAGGCCTCGTTCTTGTGA	157	0.87
392	<i>TMED</i>	ACCCTTTGCTGATTACAC	TTGTGGAAGGGTTAGCATCC	165	0.89

^a Isoforms with the same gene model identified in the PeanutBase.

^b Primers that did not produce an amplification product.

values were normalized against two reference genes, namely ACT1 and 60S, as previously established [27]. Statistical analysis of the expression rate of the mRNA transcripts in the stressed group in comparison to the control group was conducted using the Relative Expression Software Tool (REST 2009, ver. 2.0.13) [29].

3. Results and discussion

3.1. Transpiration profile, chlorophyll content, electrolyte leakage and relative water content following dry-down

In this study, plants of the wild species *A. duranensis* were submitted to a gradual decrease in soil water availability, with transpiration profiles during the four day period of stress represented by NTR behavior (Fig. 1A). The transpiration profile obtained by gravimetric measurements revealed a pattern in NTR response to soil drying in accordance with data previously observed for *A. duranensis* and other wild *Arachis* species [15,19]. While the well-watered control plants maintained a mean NTR value of 1.0 along the treatment, stressed plants presented a gradual decrease, reaching values of approximately 0.2 by the fourth day (Fig. 1A). In addition, photosynthetic pigment content (chlorophyll *a*, *b* and carotenoids), estimated by SCMR, increased when compared to control plants, which could indicate a possible adaptive response of *A. duranensis* to preserve photosynthetic efficiency (Fig. 1B–D). An increase in chlorophyll content in plants under water deficit has been observed previously, predominantly in genotypes described as drought tolerant [30,31].

Two other important drought stress indicators analyzed were leaf relative water content (RWC) and electrolyte leakage (EL). With regard to RWC, a significant reduction of 42.7% was observed between stressed and control plants (Fig. 1E). A decrease in RWC is an early response to water deficit and represents variations in osmotic adjustment, as previously observed in drought-tolerant and drought-sensitive peanut genotypes [12]. Conversely, increased water deficiency leads, in

general, to higher plasma membrane permeability, which results in increased EL [12]. Indeed, a significant increase of 21.8% in EL values was observed between the stressed and control plants (Fig. 1F). When compared to control plants, the visual phenotype of stressed *A. duranensis* plants was also compatible with typical symptoms of water deficiency (leaf wilt) (Fig. 1G), and in accordance with our previous studies [19].

3.2. Drought-responsive proteins in *A. duranensis*

The 2-DE analysis of the root proteome profile of *A. duranensis* revealed approximately 400 protein spots (Fig. 2A, Supplemental Figs. 1 and 2). Through comparison of drought stressed and control plants, a total of 59 differentially abundant proteins (p -value $\leq .05$) were detected in the stressed condition, including 15 with increased and 19 with decreased abundance. Three proteins were identified as unique to stressed plants and 22 as unique to the control condition. All 59 differentially abundant protein spots were analyzed by mass spectrometry, of which 31 were successfully identified using the MASCOT software (Fig. 2A; Table 2). These comprised 10 with increased and 13 with decreased abundance, 7 unique to the control plants and 1 unique to the stressed condition. These proteins were classified into different groups based on their predicted functions using the Mercator sequence annotation tool [32] and are discussed below.

3.2.1. Proteins related to stress

The functional category of stress contained the highest number of proteins, with 25% of proteins classified within this group (Supplemental Fig. 3). Among these proteins, two were unique to the control: unknown protein (SRPBC – spot 332) and stromal 70 kDa heat shock-related protein (HSP70 – spot 360). Five other proteins increased in abundance in response to drought: MLP-like protein 34 (MLP-34 – spots 257 and 266) MLP-like protein 43 (MLP-43 – spot 52), 17.3 kDa class I heat shock protein-like (HSP17.3 – spot 258) and HSP70 (spot

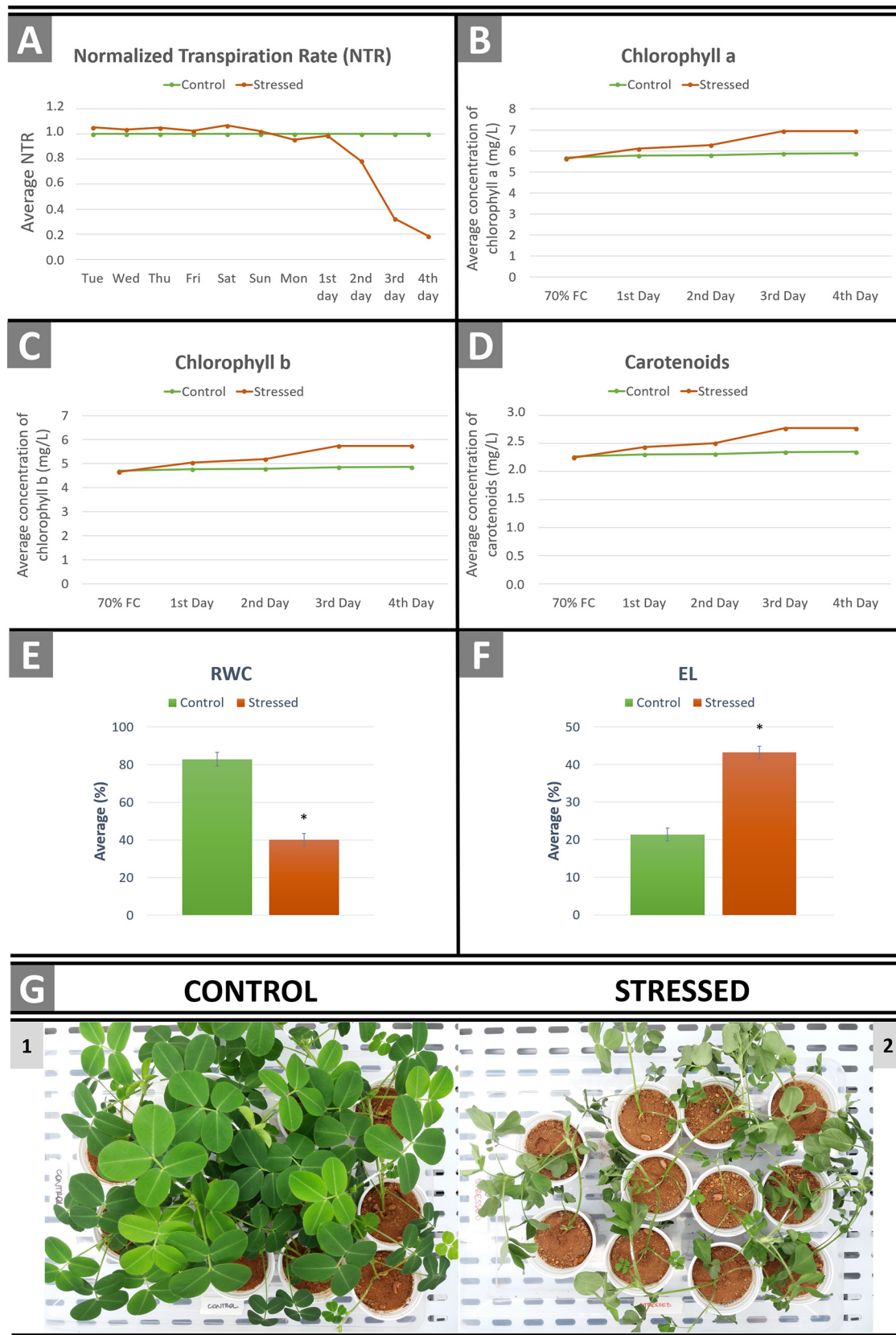


Fig. 1. *A. duranensis* plants submitted to a gradual decrease of water (dry-down). A) Normalized transpiration rate (NTR) of *A. duranensis* plants during the dry-down assay. B–D) Mean leaf content of photosynthetic pigments in control and stressed plants (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids) during the experiment. E–F) Relative water content (RWC) and electrolyte leakage (EL) in *A. duranensis* leaves at the end of the experiment (fourth day). G) 1: Healthy phenotype of the aerial part of *A. duranensis* control plants. 2: Symptoms in the aerial parts of stressed *A. duranensis* plants, showing wilt and evident desiccation of the leaves. The dry-down assay initiated with 70% of field capacity (FC), decreasing over time in stressed plants as follows: first day (1st Day) to 65% FC, second day (2nd Day) to 61% FC, the third day (3rd Day) to 57% FC, and the fourth and final day (4th Day) to 52% FC. For control plants, the soil was maintained at 70% FC along the assay.

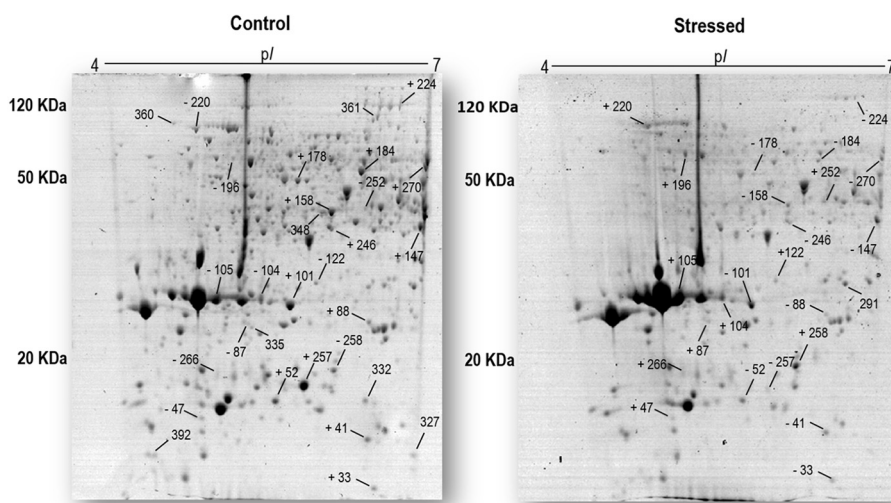


Fig. 2. Differentially abundant proteins in roots of *Arachis duranensis* under drought stress and control conditions. A) Comparative 2-D maps of control and drought stressed plants showing differentially abundant proteins. (+) increased abundance, (-) decreased abundance and () unique proteins in either condition. B) Overview of the abundance of 30 out of 31 proteins identified by the 2-DE technique in roots of *A. duranensis* plants submitted to water deficit (STR) and in the control condition (CTR). Graphs represent the fold-change of the differential abundance of proteins (Blue bar - determined by the ImageMaster 2D Platinum v.7.05 program) and the differential expression of the putative genes encoding these proteins (Orange bar - determined by qRT-PCR). Graphs without blue bars represent proteins exclusive to roots in the control (SRPBCC, TMED, Leo-1, HSP70 [spot 360], MetE and APRT) or drought stressed plants (Cht2). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

220).

Interestingly, a chitinase-2 (Cht-2 – spot 291) was identified exclusively in the stressed roots (Fig. 2A; Table 2). The class II group of chitinase enzymes has been identified in fungi, bacteria and plants. In plants, these chitinases are associated with defense responses to pathogens and tolerance to environmental stresses. Indeed, a number of studies have shown an increase in chitinase transcripts and proteins under drought conditions [33–35]. In *A. hypogaea*, a chitinase (class II) has been reported to be unique to leaves of a drought tolerant cultivar and absent in susceptible cultivars during water deficit treatment [12]. Overexpression of chitinase-encoding genes in transgenic plants has also been reported to confer drought tolerance [36,37].

Three other stress-related proteins belonging to the MLP family were also identified: one MLP-43 (spot 52) and two MLP-34 proteins (spot 257 and 266) (Fig. 2A; Table 2). MLPs belong to the Bet v 1 family with unknown biological function, but have been shown to be induced in response to pathogens and environmental stimuli, as well as during fruit/flower development [38–41]. Herein, the *A. duranensis* MLP-43 showed a decreased abundance (–1.59-fold) in response to drought. Interestingly, the two identified MLP-34 proteins revealed a strong modulation in response to the dry-down condition but with opposite abundance patterns: one displayed an increase (9.29-fold – spot 257) while the other a decrease (–5.82-fold – 266 spot) (Fig. 2A; Table 2). This contrasting behavior could be due to the presence of alternative splicing in one of the isoforms of these proteins, as observed in *A. thaliana* (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SSK7>), according to the curated database UniProt. It has been shown that protein isoforms can have distinct biological functions, as well as different expression patterns [42]. It is also possible that post-translational modifications may account for the differences in mass and pI.

Heat shock proteins (HSPs) were also associated with the stress response. These ubiquitous proteins play an important role as chaperones, acting in diverse molecular protective processes that include protein folding and degradation under stress conditions. These proteins may be located in both the cytoplasm and organelles, contributing to cellular homeostasis via cross-talk with other signaling pathways, or by cooperating with other components to decrease cell damage, as reported in previous studies on abiotic stress, especially in response to heat [43–45]. In this study, the abundance of two heat shock proteins

was increased in stressed plants: a 17.3 kDa class I heat shock protein-like (HSP17.3 – spot 258; 2.58-fold) and a stromal 70 kDa heat shock-related protein (HSP70 – spot 220; 1.63-fold). Another spot identified as HSP70 (spot 360) was exclusive to the control group (Fig. 2A 1; Table 2). This difference in abundance may be due to the existence of several isoforms of HSP70, with different responses to the same stimulus [46]. Another possibility is the occurrence of post-translational modification, since both HSP70 protein spots presented different pI and MW (Table 2). Previous proteomic studies revealed the modulation of several heat shock proteins, including HSP70 and/or HSP17.3 proteins, in peanut leaves (*A. hypogaea* L.) under cold stress [47] and under drought stress [8,12,48].

3.2.2. Proteins related to RNA processing and with unassigned function

In addition to the six proteins associated to stress response, two additional proteins appear to be involved in the drought tolerance response in wild *Arachis* plants, belonging to the functional categories “Not assigned” and “RNA” (Supplemental Fig. 3). These proteins, namely a glycine-rich protein DOT1-like (DOT-1 – spot 47–4.94-fold) and a Maturase K (MatK – spot 252–7.67-fold), displayed decreased abundance in drought stressed plants. Although DOT-1 was detected without a known function (not assigned, unknown) according to classification with the Mercator sequence annotation tool, studies have associated glycine-rich proteins with biological processes that include cell wall structure, plant defense and abiotic stresses, including drought [49–53]. Conversely, Maturase K is associated with RNA processing (Supplemental Fig. 3; Table 2). Maturases are involved in splicing type II introns and therefore in transcription and post-transcription processes [54]. These proteins are found in bacteria and organellar genomes of different eukaryotes (protists, fungi, plants and some animals), and include mitochondria (MatR) and chloroplast (MatK) [54–56]. In plants, MatK is a general chloroplast splicing factor, acting in the splicing of pri-mRNA into mature mRNA [54,57]. Malik et al. (2017) also reported MatK of *Bowenia* sp. with a high homology with the nMAT2 and nMAT4 proteins, indicating the possibility for certain nMATs to perform splicing in both mitochondria and chloroplasts. It has been shown that MatK is highly induced during salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum* L.), under cold stress in snow lotus leaves (*Saussurea laniceps*) and in response to long-term manganese toxicity in

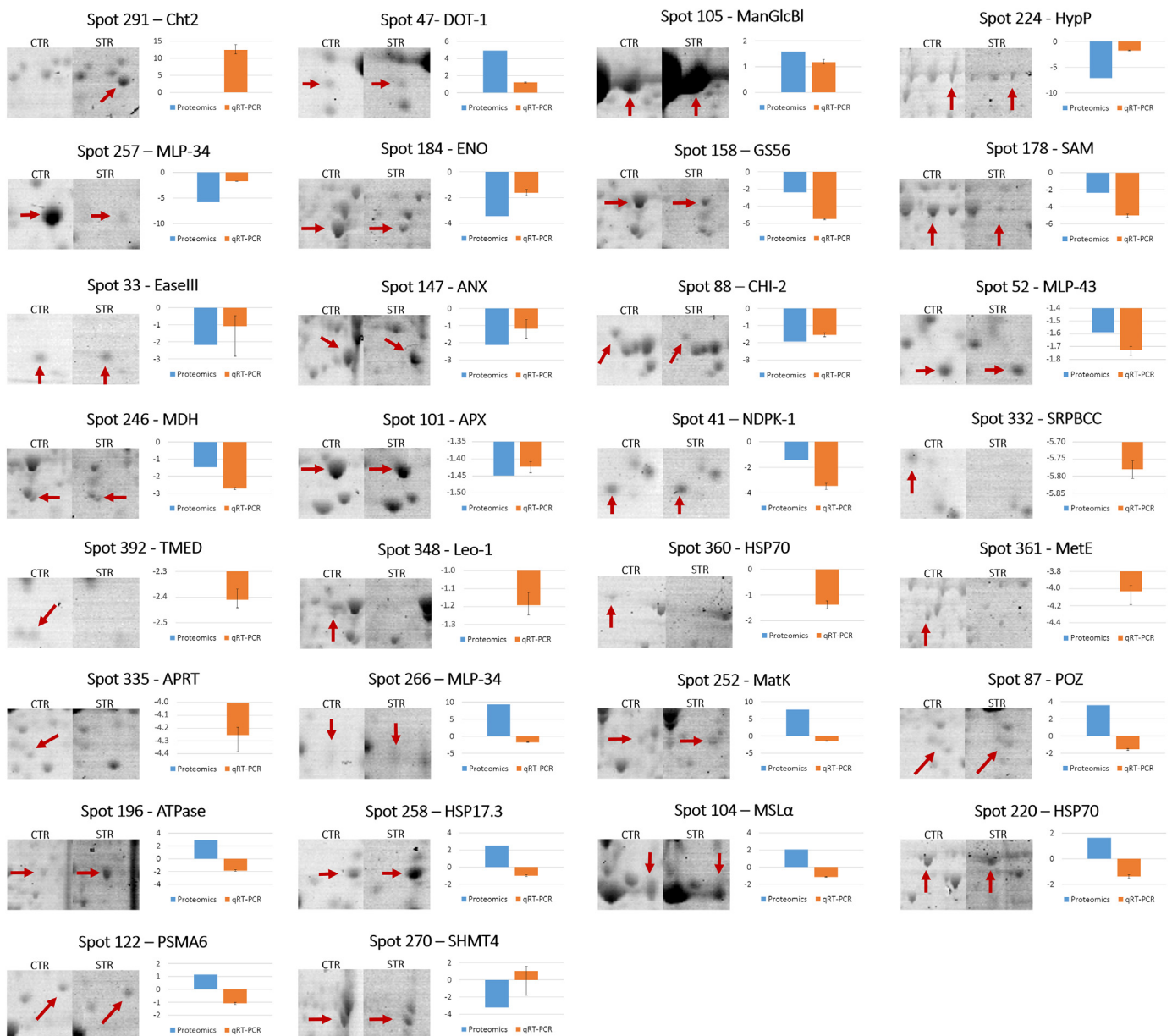


Fig. 2. (continued)

Citrus roots [58]. In contrast, Xiao et al. [59], when comparing two populations of poplar (*Populus cathayana*) under drought conditions, one from a dry climate region and the other from a rainy/humid climate, observed a decrease in the abundance of a MatK protein in the dry climate-adapted population. The increased abundance of DOT-1 and MatK drought-responsive proteins in wild *Arachis* plants suggests that they may participate in the maintenance of cellular structure and adaptation process to drought conditions.

3.3. Unique proteins detected in the control condition

It is noteworthy that 22 proteins were unique to roots in the control condition (Supplemental Table 1), seven of which were identified: a mixture of proteins [transcription initiation factor IIF subunit alpha-like (TFIIF) and Uncharacterized protein – spot 327], predicted protein (Leo-like protein [Leo-1] – spot 348); unknown protein (SRPBCC ligand-binding domain superfamily [SRPBCC] – spot 332), adenine phosphoribosyl transferase (APRT – spot 335), stromal 70 kDa heat shock-related protein (HSP70 – spot 360), cobalamine-independent

methionine synthase (MetE – spot 361) and predicted protein (Transmembrane emp24 domain-containing protein p24delta9-like [TMED] – spot 392) (Table 2). According to Mercator-based sequence annotation, the proteins were classified in different functional categories relating to abiotic/biotic stress, amino acid and nucleotide metabolism, transport and regulation of transcription (Table 2). In general, a downregulation of gene expression is reported in the literature in diverse plant species in response to drought [60–63]. Considering that *A. duranensis* might possess mechanisms enabling higher levels of drought tolerance, it is possible that these proteins are constitutively present to rapidly perceive and respond to water deficit and are then decreased at later stages of the stress. These proteins may be further investigated through overexpression of their corresponding transcript, with TFIIF being an interesting candidate, considering that transcription factors are important components of the drought stress response, responsible for the regulation of several potential target genes [64,65].

Table 2
Differentially abundant proteins identified by mass spectrometry in *A. duranensis* control and water stressed roots.

Protein spot	Protein description and abbreviation	Peptide sequence ^a	Organism	Accession ^b	Mass (kDa) theor.	Mass (kDa) exp.	pI theor.	pI exp.	Mascot score	Coverage (%/N ^c of matched peptides (MS))	Fold Change ^c	
Amino acid metabolism												
178*	S-adenosylmethionine synthase (SAM)	-	<i>Actinidia chinensis</i>	P50303	39	50	6.20	5.79	126	30/10	-2.39	
		K.TIFHLNPSGR.F	<i>Arachis hypogaea</i>	AFN54653	43		5.16		67	2/1		
		R.FVIGGPHGDAGLTGR.K	<i>Arachis hypogaea</i>	AFN54653	43		5.16		114	3/1		
		K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGLTK.K	<i>Petunia x hybrida</i>	P48498			5.47		48	30/10		
361	Cobalamine-independent methionine synthase (MetE)	K.YGAGIGPGVYDIHSR.I	<i>Solenostemon scutellaroides</i>	CAA89019	87	89	6.17	6.49	52	2/1	Unique to control	
Cl-metabolism												
270	Serine hydroxymethyltransferase 4 (SHMT4)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AGL08226	52	55	6.65	6.92	187	41/22	-3.20	
		K.LLICGGSAYPR.D		AGL08215	52		6.84		61	2/1		
		K.NAVFGDSSALAPGVGR.I		AGL08215	52		6.84		78	3/1		
		K.ISATSIFYFESLPYK.V		AGL08215	52		6.84		53	2/1		
		K.VNSQTYDYIDRLEEK.A		AGL08215	52		6.84		51	3/1		
		R.YYGGNEYDIENLCR.A		AGL08215	52		6.84		61	3/1		
Cell organisation												
147	Annexin	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AKE98365	36	37	7.10	6.88	199	48/16	-2.12	
	Annexin	K.LLLPLVSSRY.Y	<i>Arachis hypogaea</i>	AKE98365	36		7.10		38	3/1		
	Annexin	K.ADPKDEFLALLR.S	<i>Lavatera thuringiaca</i>	AA871830	36		6.06		72	3/1		
	Annexin	K.ALDKELSNDFER.L	<i>Arachis hypogaea</i>	AKE98365	36		7.10		69	3/1		
	Fiber annexin, partial	R.WTSSNQVIMEIATR.S	<i>Arachis hypogaea</i>	ACF74290	18		5.97		88	9/1		
	Fiber annexin, partial (ANX)	K.SLEEDVAHHTTGFRK.L	<i>Arachis hypogaea</i>	ACF74290	18		5.97		84	10/1		
		R.IPQPVPVADDEQLRK.A	<i>Arachis hypogaea</i>	AKE98365	36		7.10		199	48/16		
DNA synthesis												
33	Predicted protein (Endonuclease III homolog 2, chloroplastic-like isoform X4) (Easell)	-	<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009799827	32	12	9.60	6.48	78	19/6	-2.19	
Glycolysis												
184	Predicted protein (Enolase)	-	<i>Glycine max</i>	XP_003521438		53	5.49	6.35	116	35/12	-3.39	
	Enolase	K.VNQIGSVTESEAVR.M	<i>Ricinus communis</i>	P42896			5.56		106	3/1		
	Enolase	R.AAVPSGASTGIVEALELR.D	<i>Ricinus communis</i>	P42896			5.56		105	4/1		
	Enolase	R.IEEELGDAAYAGANFR.A	<i>Triticum urartu</i>	EMS66544			5.21		127	3/1		
	Enolase (ENO)	R.GNPTVEVDLITCSDDGTFAR.A	<i>Glycine max</i>	NP_001237329			5.31		93	4/1		
Metal handling												
178*	S-adenosylmethionine synthase (SAM)	-	<i>Actinidia chinensis</i>	P50303	39	50	6.20	5.79	126	30/10	-2.39	
		K.TIFHLNPSGR.F	<i>Arachis hypogaea</i>	AFN54653	43		5.16		67	2/1		
		R.FVIGGPHGDAGLTGR.K	<i>Arachis hypogaea</i>	AFN54653	43		5.16		114	3/1		
		K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGLTK.K	<i>Petunia x hybrida</i>	P48498			5.47		48	5/1		
Mitochondrial electron transport/ATP synthesis												
196	F0F1-type ATP synthase, beta subunit	-	<i>Medicago truncatula</i>	KEH44140	59	59	5.80	5.19	117	33/14	2.89	
	ATP synthase subunit beta	R.FTQANSEVSALLGR.I	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	P17614	59		5.95		48	2/1		
	ATP synthase subunit beta (ATPase)	R.IPSAVGYQPTLATDGLGQER.I	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	P17614	59		5.95		75	3/1		
Not assigned												
47	Glycine-rich protein DOT1-like (DOT-1)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015942611	14	16	5.21	4.99	82	7/1	4.94	
327	Mixture	-	<i>Phoenix dactylifera</i>	XP_008775984	33	13	6.28	6.76	88	21/6	Unique to control	
	Predicted protein (transcription initiation factor IIF subunit alpha-like)	-	<i>Glycine max</i>	XP_014627905	16		9.95			34/5		
	Predicted protein (Uncharacterized protein) (TPIIF)	-										

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Protein spot	Protein description and abbreviation	Peptide sequence ^a	Organism	Accession ^b	Mass (kDa) theor.	Mass (kDa) exp.	pI theor.	pI exp.	Mascot score	Coverage (%/N ^c of matched peptides (MS))	Fold Change ^c	
348	Hypothetical protein (Plant-specific B3-DNA binding domain)	-	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002325640	88	40	8.15	5.98	85	9/7	Unique to Control	
	Predicted protein (Leo1-like protein) (Leo-1)	K.NIFGSDEDDDDGDR.V	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	XP_001422426	41		4.15		27	4/1		
N-metabolism												
158	Glutamine synthetase GS56, partial	-	<i>Arachis hypogaea</i>	ACF74298	17	42	4.99	6.09	80	70/7	-2.37	
	Hypothetical protein (Glutamine synthetase, beta-Grasp domain)	K.HKDHIAAYGEGNER.R	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002972155	41		6.04		87	3/1		
	Glutamine synthetase GS56, partial	R.IIAEYIWGGSGMDIR.S	<i>Arachis hypogaea</i>	ACF74298	17		4.99		89	10/1		
	Glutamine synthetase 1a	R.LLTGKHETADHFFSWGVANR.G	<i>Lolium perenne</i>	ACR45959	39		5.40		71	5/1		
Nucleotide metabolism												
41	Nucleoside diphosphate kinase 1 (NDPK1)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AAZ20283	16	15	6.30	6.41	92	40/6	-1.43	
		K.LLIGATNPLASEPQTIR.G							68	10/1		
		R.KLIGATNPLASEPQTIR.G							85	11/1		
335	Adenine phosphoribosyl transferase (APRT)	K.AFKDTIDLFVER.Y	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_192981	20	24	5.24	5.38	52	6/1	Unique to Control	
		R.YRDQNISVVAGVEAR.G	<i>Trifolium repens</i>	ADD09567	20		5.36		48	8/1		
Protein (degradation and posttranslation modification)												
87	Speckle-type POZ protein-like protein (POZ)	-	<i>Aegilops tauschii</i>	EMT12448	39	25	6.56	5.35	88	21/8	3.57	
105*	Mannose/glucose-binding lectin precursor (ManGlcbl)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AA74576	28	27	5.36	5.11	83	26/8	1.59	
		R.VLHSTQVR.L		AA74572	30		5.71		58	2/1		
		R.DHLPWGR.V		AA74575	28		5.95		51	3/1		
		R.RDQTLNVLVTYDANSKN		AA74576	28		5.36		65	6/1		
		-LDSLSFSYNNFEQDDER.N		AA74576	28		5.36		140	6/1		
		-LDSLSFSYNNFEQDDERNLILQGDAKF		AA74576	28		5.36		110	10/1		
122	Hypothetical protein (Proteasome_alpha_type_6) (PSMA6)	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007133143	27	29	5.58	5.96	149	47/12	1.15	
Redox												
101	Cytosolic ascorbate peroxidase (APX)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	ABM45856	27	26	5.52	5.75	222	70/20	-1.45	
		K.GSDHLRDRVFGK.A		ABM45856	27		5.52		59	4/1		
		R.LAWHSAGTFEDVATK.T		AAZ20282	26		6.00		96	5/1		
		K.ALLSDPFRPLVEKY		AAZ20282	26		6.00		56	5/1		
		K.HPSELAHGANAAGLDIAVR.L		AAZ20282	26		6.00		133	7/1		
		K.YAADEDAFFADYAEAHK.L		AAZ20282	26		6.00		156	7/1		
		R.SGFEGPWTSNPLIFDINSYFK.E		AAZ20282	26		6.00		65	8/1		
RNA (processing splicing)												
252	Maturase K, partial (chloroplast) (MatK)	-	<i>Chamaecrista absus</i>	AFU54444	33	42	9.68	6.43	81	21/6	7.67	
Secondary metabolism												
88	Type II chalcone isomerase (CHI-2)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AJF45950	24	25	5.99	6.42	113	45/8	-1.94	
		K.FSKDDTPEHR.N							55	4/1		
		K.TPAQLLDSLHFYR.D							80	5/1		
Signaling												
104	Mannose-specific lectin CML-2 (MSL α)	R.ALYLAQHVLSDK.S	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015942682	30	27	5.48	5.49	80	4/1	2.07	
		K.VIAVEFDTFDR.S							49			
105*	Mannose/glucose-binding lectin precursor (ManGlcbl)	-	<i>Arachis hypogaea</i>	AA74576	28	27	5.36	5.11	83	26/8	1.59	
		R.VLHSTQVR.L		AA74572	30		5.71		58	2/1		
		R.DHLPWGR.V		AA74575	28		5.95		51	3/1		
		R.RDQTLNVLVTYDANSKN		AA74576	28		5.36		65	6/1		
		-LDSLSFSYNNFEQDDER.N		AA74576	28		5.36		140	6/1		
		-LDSLSFSYNNFEQDDERNLILQGDAKF		AA74576	28		5.36		110	10/1		

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Protein spot	Protein description and abbreviation	Peptide sequence ^a	Organism	Accession ^b	Mass (kDa) theor.	Mass (kDa) exp.	pI theor.	pI exp.	Mascot score	Coverage (%/N ^o of matched peptides (MS))	Fold Change ^c	
<i>Stress abiotic and biotic</i>												
52	MLP-like protein 43 (MLP43)	K.HWDYTIIEGK-K K.HWDYTIIEGKK.T K.HKENITAAASPSQSYLDFAIK-V	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015946820	17	16	5.97	5.65	63	5/1 6/1 12/1	-1.59	
257	MLP-like protein 34 (MLP34)	- K.HWTYVIDGK-V K.QLHHVQNVCR.V K.LYDGDVDSQHYK-D K.KLHHVQNVCR.V	<i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis ipaensis</i> <i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis duranensis</i>	XP_015936926 XP_015936833 XP_016170840 XP_015936926 XP_015936833	17	17	5.76	5.88	116 72 69 88 81	50/9 5/1 7/1 7/1 7/1	-5.82	
258	17.3 kDa class I heat shock protein-like (HSP17.3)	- K.EDKGDITWHR.M R.SDFANETTAIANTR.I	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015931443	18	18	6.19	6.13	98	43/7 5/1 8/1	2.51	
266	MLP-like protein 34 (MLP34)	-	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015936926	17	18	5.76	5.11	113	8/1	9.29	
291	Chitinase (class II) (ChT2)	R.AFPAPFGTTGDDVTR-K R.GEAHGFYTYNAFVTAAR-A K.IGYGNSLDCANQQHF.- R.GPIQLTNSNYQLAGQAIA K.HWTYVMDGKV + Oxidation (M) K.FLNMMLRSAANYKL + Oxidation (M) K.HWTYVMDGKV + Oxidation (M)	<i>Arachis hypogaea</i>	CAA57774	29	28	6.29	6.65	70	5/1 110 95 59 52 50	Unique to stressed	
332	Unknown protein (SRPBCC ligand-binding domain superfamily) Uncharacterized protein (SRPBCC)	-	<i>Medicago truncatula</i> <i>Theobroma cacao</i>	AFK46559 XP_007032516	18 13	16	5.44 9.33	6.33	52 50	5/1 21/12	Unique to control	
220	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (HSP70)	-	<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006858478	75	81	5.36	4.86	111	25/15	1.63	
360	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic (HSP70)	-	<i>Amborella trichopoda</i>	XP_006858478	75	90	5.36	4.64	167	25/15	Unique to Control	
<i>TCA/org transformation</i>												
224	Hypothetical protein (Aconitase A catalytic domain) (Hypp)	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007132546	93	106	6.87	6.69	82	15/11	-7.15	
246	Predicted protein (malate dehydrogenase) Malate dehydrogenase precursor nodule-enhanced Predicted protein (malate dehydrogenase) Malate dehydrogenase precursor nodule-enhanced	- K.GVDVVVIPAGVPR.K K.TKPSASFDEIEELTVR.I	<i>Vitis vinifera</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Glycine max</i>	XP_002283619 AAB99757 AAC24855	44 43 43	38	8.09 8.11 6.91	6.10	78 46 60	17/7 3/1 4/1	-1.46	
<i>Transport</i>												
392	Predicted protein (Transmembrane emp24 domain-containing protein p24delta9-like) (TMED)	-	<i>Elaeis guineensis</i>	XP_010926589	24	13	8.14	4.52	87	19/5	Unique to Control	

^a The symbol “.” indicates that peptide mass fingerprinting (PMF) and no peptide sequence was generated.

^b More than one accession cited indicates different hits for peptides identified from the same protein.

^c Fold Change is expressed by spot ratio, comparing between stressed and control spot volumes. Unique spot proteins to each treatment are listed as that. The “-” signal indicates decreased proteins.

* These proteins appeared in more than one functional category according to Mercator sequence annotation tool.

3.4. Comparative proteome and gene expression analysis

Expression levels for genes encoding the identified proteins were examined by qRT-PCR in order to verify correlation between the data sets. For this, the *A. duranensis* gene models corresponding to each of the 31 identified proteins were obtained from PeanutBase (www.peanutbase.org) and specific primers designed (Table 1; Supplemental Table 2). For the proteins showing two isoforms, HSP70 (spots 220 and 360) and MLP-34 (spots 257 and 266), only one gene model was found for each, namely Aradu.24A4H and Aradu.D4Z5N, respectively (Supplemental Table 2), with each therefore generating only one qPCR profile. All of the tested primer pairs showed high efficiency, ranging from 0.81 to 0.89 (Table 1). Melting curve analysis supported the specificity of amplification of all transcripts as a single amplicon, with the exception of transcript Aradu.NGG06, corresponding to the TFIIIF protein (spot 327), which was excluded from the analysis. In total, 30 qRT-PCR expression profiles were obtained, corresponding to 28 distinct transcripts.

qRT-PCR analysis revealed that the majority of the transcripts examined in stressed roots showed a downregulation pattern (Fig. 2B; Supplemental Table 2). Only four genes were upregulated, encoding a chitinase-2 (Cht2), a glycine-rich protein DOT1-like (DOT-1), a manose/glucose-binding lectin precursor (ManGlcBl) and a serine hydroxymethyltransferase 4 (SHMT4). Interestingly, comparative analysis between protein abundance and qRT-PCR expression profiles showed that most proteins and genes (21 of 30) displayed similar behaviors

(Fig. 2B), confirming abundance data observed through 2-DE profiling.

The results obtained by 2-DE and qRT-PCR analyses were further compared with *in silico* transcriptome data obtained by our group from *A. duranensis* (accession K7988), where plants were submitted to dehydration by withdrawal of hydroponic nutrient solution [20]. In this previous study, roots were collected at seven time-points during the early stages of dehydration and cDNA libraries analyzed by RNA-seq (BioProject number PRJNA284674). Protein abundance and gene expression values obtained by qRT-PCR were plotted together with the *in silico* transcriptome data in a heatmap graph using the program R. Most of the transcripts encoding the proteins identified in this study (27 out of 31) were also found in the *A. duranensis* transcript dataset. When all three approaches were compared, a similar expression behavior was obtained for 15 genes (Fig. 3), out of which 14 were downregulated. Only the gene encoding chitinase (Cht2; spot 291), the protein product unique to stressed plants in proteomic analysis, was upregulated in all analyses. Five genes displayed contrasting expression patterns when comparing proteomic and transcriptomic (RNA-seq and qRT-PCR) analyses, including genes encoding MLP-like protein 34 (MLP-34; spot 266), maturase K (MatK; spot 252), ATP synthase subunit *beta* (ATPase; spot 196), 17.3 kDa class I heat shock protein-like (HSP17.3; spot 258) and hypothetical protein (PSMA6; spot 122) (Fig. 3; Supplemental Table 2).

Cluster analysis of the data obtained from proteomic, *in silico* transcriptomic and qRT-PCR analyses enabled the classification of 23 genes and their proteins into five clusters (1–5) according to similarities in

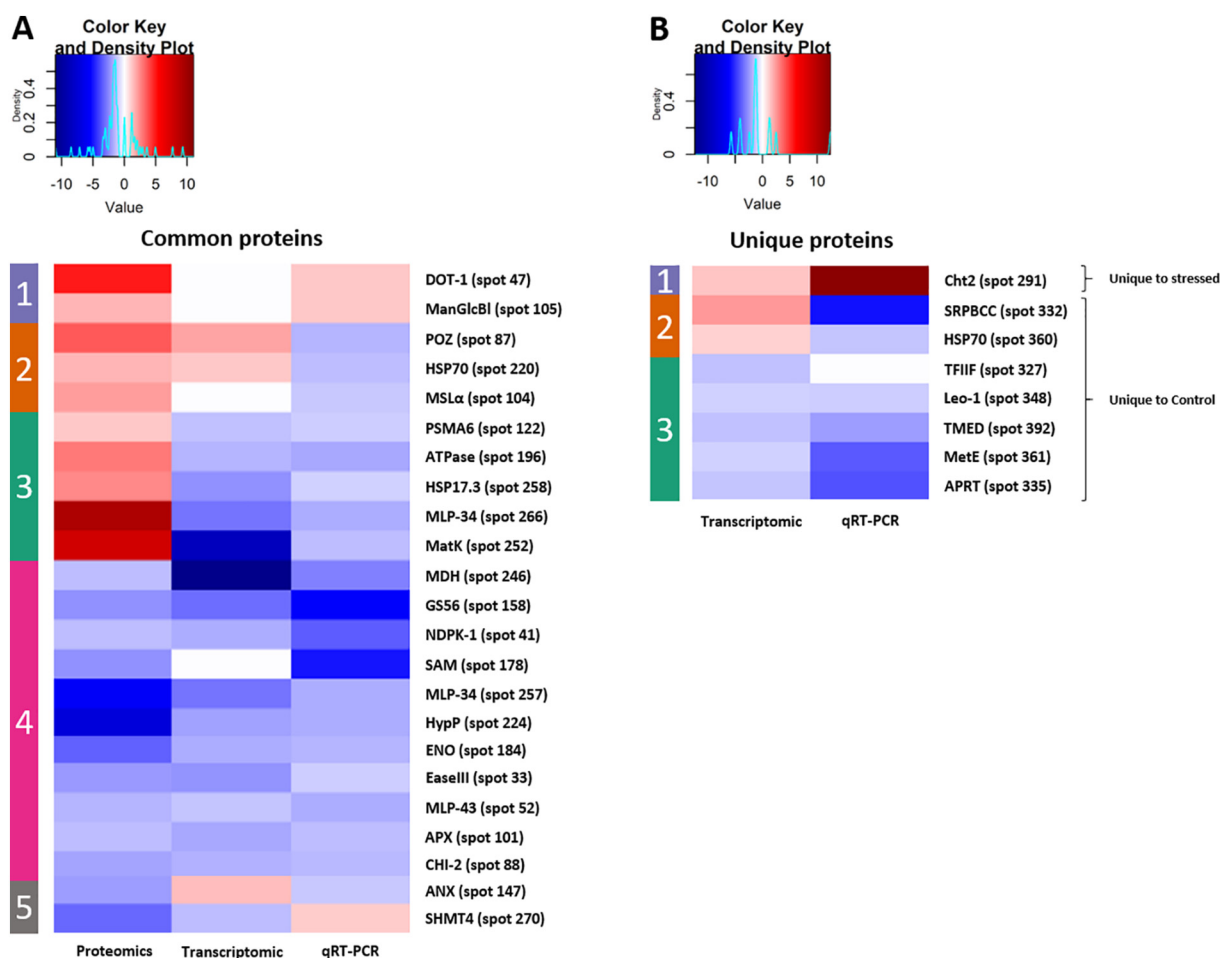


Fig. 3. Heatmap of proteome and transcriptome (*in silico* and qRT-PCR) differential expression in drought stressed and control roots of *A. duranensis*. A) Clustering analysis of differentially abundant proteins and their corresponding mRNAs (*in silico* and qRT-PCR). B) Clustering analysis of unique proteins and their corresponding mRNAs (*in silico* and qRT-PCR). In the red-blue scale, darker red colors indicate the most upregulated and the darker blue the most downregulated genes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

their transcript levels and protein abundance (Fig. 3A). In the largest cluster (cluster 4), all 11 representatives were negatively regulated in the three analyses, except for the gene encoding SAM (spot 178), for which the corresponding transcript was not found. The remaining clusters (2, 3 and 5) revealed distinct expression behaviors in the analyses. Cluster 1 grouped proteins and mRNAs with the same positive regulation in response to stress, although no transcripts could be identified in the transcriptome dataset (Fig. 3A). Clusters 2 and 3 were formed by representatives that showed contrasting expression behavior, *i.e.*, proteins with increased abundance in 2-DE analysis, but with negative gene expression in *in silico* transcriptome and/or qRT-PCR expression analyses. Cluster 5 grouped proteins with decreased abundance and upregulation in transcriptome or qRT-PCR analyses. Cluster analysis of the proteins unique to a specific treatment was also performed (Fig. 3B), identified either in the stressed treatment (Cht2) or in the control (SRPBCC, HSP70, TFIIF, APRT, TMED, Leo-1 and MetE). Three clusters were formed for these proteins and their corresponding gene transcripts, with the largest cluster (cluster 3) comprising five proteins shown to be unique in the control but downregulated in response to water deficit in both *in silico* and qRT-PCR expression analyses (Fig. 3B), with the exception of TFIIF, for which no amplification *via* qRT-PCR was observed. Interestingly, cluster 1 contained only one representative, for a chitinase (cht2) highlighted for being modulated only in stressed *Arachis* roots and showing a matching positive regulation in gene expression based on both *in silico* transcriptome and qRT-PCR expression analyses (Fig. 3B).

Although plant response to drought is a highly dynamic process, the data obtained in our study on responses to limited water availability in *A. duranensis* at the transcriptional and translational level were mostly in agreement. In plants it is known that different strategies can be activated to control mRNA synthesis and availability, as well as protein activity in response to environmental stimuli. Here, *A. duranensis*, appears to perceive limited soil water availability through mechanisms associated with the negative regulation of mRNA expression. According to the results obtained, the comprehensive characterization of protein abundance, combined with corresponding gene expression data further our understanding of tolerance responses to drought in wild species of *Arachis*. The proteins highlighted represent candidates for functional analysis, based on overexpression or silencing approaches in both model plants and *Arachis*.

4. Conclusion

Using a proteomic approach, we showed for the first time that different proteins are modulated during water deficit in *A. duranensis* root tissues. Several candidate proteins were identified, in particular those associated to stress response, namely Cht2, MLP-34, heat shock proteins (HS70 and HS17.3), DOT-1 and MatK. Transcriptional profiles revealed that most genes showed downregulation patterns in stressed roots of *A. duranensis* plants. Moreover, the comparative analysis between proteomic, qRT-PCR and *in silico* expression profiles showed that most proteins and transcripts presented similar behavior in response to water deficit, with the majority downregulated in stressed roots. This is likely a preferential regulatory mechanism employed in *A. duranensis* to perceive stress and seek routes to withstand drought.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jpropt.2018.09.011>.

Acknowledgement

The research was supported by grants from Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

References

- [1] H. Wang, X. Guo, M.K. Pandey, X. Ji, R.K. Varshney, V. Nwosu, et al., History and impact of the international peanut genome initiative: the exciting journey toward peanut whole-genome sequencing, in: R.K. Varshney, M.K. Pandey, N. Puppala (Eds.), *The Peanut Genome*. Cham, Springer International Publishing, 2017, pp. 117–133.
- [2] M. Farooq, N. Gogoi, S. Barthakur, B. Baroowa, N. Bharadwaj, S.S. Alghamdi, et al., Drought stress in grain Legumes during reproduction and grain filling, *J. Agron. Crop Sci.* 203 (2016) 81–102.
- [3] J.N. Banavath, T. Chakradhar, V. Pandit, S. Konduru, K.K. Guduru, C.S. Akila, et al., Stress Inducible overexpression of AtHDG11 leads to improved drought and salt stress tolerance in peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Front. Chem.* 6 (2018).
- [4] S. Wu, F. Ning, Q. Zhang, X. Wu, W. Wang, Enhancing omics research of crop responses to drought under field conditions, *Front. Plant Sci.* 8 (2017) 174.
- [5] A. Janiak, M. Kwaśniewski, I. Szarejko, Gene expression regulation in roots under drought, *J. Exp. Bot.* 67 (2016) 1003–1014.
- [6] B. Valliyodan, H.T. Nguyen, Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006) 189–195.
- [7] M. Farooq, A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, S.M.A. Basra, Plant drought stress: effects, mechanisms and management, *Agron. Sustain. Dev.* 29 (2009) 185–212.
- [8] K.R. Kottapalli, R. Rakwal, J. Shibato, G. Burow, D. Tissue, J. Burke, et al., Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes, *Plant Cell Environ.* 32 (2009) 380–407.
- [9] K. Chmielewska, P. Rodziewicz, B. Swarczewicz, A. Sawikowska, P. Krajewski, L. Marczak, et al., Analysis of drought-induced proteomic and metabolomic changes in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and roots unravels some aspects of biochemical mechanisms involved in drought tolerance, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1108.
- [10] X. Yu, A. Yang, A.T. James, Comparative proteomic analysis of drought response in roots of two soybean genotypes, *Crop Pasture Sci.* 68 (2017) 609–619.
- [11] C. Akkasageng, N. Tantisuwichwong, N.O. Ngamhui, S. Roytrakul, S. Jogloy, A. Pathanothai, Changes in protein expression in peanut leaves in the response to progressive water stress, *Pak. J. Biol. Sci.* 18 (2015) 19–26.
- [12] R. Katam, K. Sakata, P. Suravajhala, T. Pechan, D.M. Kambiranda, K.S. Naik, et al., Comparative leaf proteomics of drought-tolerant and -susceptible peanut in response to water stress, *J. Proteome* 143 (2016) 209–226.
- [13] A. Ghatak, P. Chaturvedi, M. Nagler, V. Roustan, D. Lyon, G. Bachmann, et al., Comprehensive tissue-specific proteome analysis of drought stress responses in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (Pearl millet), *J. Proteome* 143 (2016) 122–135.
- [14] D. Ghosh, J. Xu, Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective, *Front. Plant Sci.* 5 (2014).
- [15] S.C.M. Leal-Bertioli, D.J. Bertioli, P.M. Guimarães, T.D. Pereira, I. Galhardo, J.P. Silva, et al., The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits, *Environ. Exp. Bot.* 84 (2012) 17–24.
- [16] P.C. Nautiyal, K. Rajgopal, P.V. Zala, D.S. Pujari, M. Basu, B.A. Dhadhal, et al., Evaluation of wild *Arachis* species for abiotic stress tolerance: I. Thermal stress and leaf water relations, *Euphytica* 159 (2008) 43–57.
- [17] D.A. Knauff, D.W. Gorbet, Genetic diversity among peanut cultivars, *Crop Sci.* 29 (1989) 1417–1422.
- [18] S.C.M. Leal-Bertioli, D.J. Bertioli, P.M. Guimarães, T.D. Pereira, I. Galhardo, J.P. Silva, et al., The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits, *Environ. Exp. Bot.* 84 (2012) 17–24.
- [19] A.C.M. Brasileiro, C.V. Morgante, A.C.G. Araújo, S.C.M. Leal-Bertioli, A.K. Silva, A.C.Q. Martins, et al., Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes, *Plant Mol. Biol. Report.* 33 (2015) 1876–1892.
- [20] C.C. Vinson, A.P.Z. Mota, T.N. Oliveira, L.A. Guimaraes, S.C.M. Leal-Bertioli, et al., Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species, *PLoS One* 13 (2018) e0198191.
- [21] D.J. Bertioli, S.B. Cannon, L. Froenicke, G. Huang, A.D. Farmer, E.K.S. Cannon, et al., The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut, *Nat. Genet.* 48 (2016) 438.
- [22] R.C. Muchow, T.R. Sinclair, Water deficit effects on maize yields modeled under current and “greenhouse” climates, *Agron. J.* 83 (1991) 1052–1059.
- [23] M.S. Sheshshayee, H. Bindumadhava, N.R. Rachaputi, T.G. Prasad, M. Udayakumar, G.C. Wright, et al., Leaf chlorophyll concentration relates to transpiration efficiency in peanut, *Ann. Appl. Biol.* 148 (2006) 7–15.
- [24] B. Yang, X. Zhou, R. Xu, J. Wang, Y. Lin, J. Pang, et al., Comprehensive analysis of photosynthetic characteristics and quality improvement of purple cabbage under different combinations of monochromatic light, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1788.
- [25] Brito Ggd, V. Sofiatti, MMdA Lima, Carvalho Lpd, Silva Filho Jld, Physiological traits for drought phenotyping in cotton, *Acta Scient. Agron.* 33 (2011) 117–125.
- [26] L.S. Carmo, R.O. Resende, L.P. Silva, S.G. Ribeiro, A. Mehta, Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*, *Proteomics* 13 (2013) 1947–1960.
- [27] C.V. Morgante, P.M. Guimarães, A.C. Martins, A.C. Araújo, S.C. Leal-Bertioli, D.J. Bertioli, et al., Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut, *BMC Res. Notes* 4 (2011) 339.
- [28] S. Zhao, R.D. Fernald, Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction, *J. Comput. Biol.* 12 (2005) 1047–1064.
- [29] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e36.

- [30] M. Zaefyzadeh, R.A. Quliyeve, S.M. Babayeva, M.A. Abbasov, The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces, *Turk. J. Biol.* 33 (2009) 1–7.
- [31] P. Larkunthod, N. Nounjan, J.L. Siangliw, T. Toojinda, J. Sanitchon, B. Jongdee, et al., Physiological responses under drought stress of improved drought-tolerant rice lines and their parents, *Notulae Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 46 (2018).
- [32] M. Lohse, A. Nagel, T. Herter, P. May, M. Schroda, R. Zrenner, et al., Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data, *Plant Cell Environ.* 37 (2014) 1250–1258.
- [33] A. Grover, Plant Chitinases: genetic diversity and physiological roles, *Crit. Rev. Plant Sci.* 31 (2012) 57–73.
- [34] T. Ye, H. Shi, Y. Wang, Z. Chan, Contrasting changes caused by drought and submergence stresses in bermudagrass (*Cynodon dactylon*), *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 951.
- [35] P. Li, Y. Zhang, X. Wu, Y. Liu, Drought stress impact on leaf proteome variations of faba bean (*Vicia faba* L.) in the Qinghai–Tibet Plateau of China, *3 Biotech.* 8 (2018) 110.
- [36] Y. Kwon, S.H. Kim, M.S. Jung, M.S. Kim, J.E. Oh, H.W. Ju, et al., Arabidopsis hot2 encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses, *Plant J.* 49 (2007) 184–193.
- [37] M. Raeini Sarjaz, V. Chalavi, Effects of water stress and constitutive expression of a drought induced chitinase gene on water-use efficiency and carbon isotope composition of strawberry, (2011).
- [38] P. Osmark, B. Boyle, N. Brisson, Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins, *Plant Mol. Biol.* 38 (1998) 1243–1246.
- [39] B. Ruperti, C. Bonghi, F. Ziliotto, S. Pagni, A. Rasori, S. Varotto, et al., Characterization of a major latex protein (MLP) gene down-regulated by ethylene during peach fruitlet abscission, *Plant Sci.* 163 (2002) 265–272.
- [40] C.L. Yang, S. Liang, H.Y. Wang, L.B. Han, F.X. Wang, H.Q. Cheng, et al., Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive factor 6 in defense against *Verticillium dahliae*, *Mol. Plant* 8 (2015) 399–411.
- [41] Y. Wang, L. Yang, X. Chen, T. Ye, B. Zhong, R. Liu, et al., Major latex protein-like protein 43 (MLP43) functions as a positive regulator during abscisic acid responses and confers drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 67 (2016) 421–434.
- [42] M. Stastna, J.E. Van Eyk, Analysis of protein isoforms: can we do it better? *Proteomics* 12 (2012) 2937–2948.
- [43] C.J. Park, Y.S. Seo, Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity, *Plant Pathol. J.* 31 (2015) 323–333.
- [44] M.S. Haider, C. Zhang, M.M. Kurjogi, T. Pervaiz, T. Zheng, C. Zhang, et al., Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological and RNA-Seq analysis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 13134.
- [45] M. Wang, Z. Zou, Q. Li, K. Sun, X. Chen, X. Li, The CsHSP17.2 molecular chaperone is essential for thermotolerance in *Camellia sinensis*, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1237.
- [46] I. Jungkunz, K. Link, F. Vogel, M. Voll Lars, S. Sonnewald, U. Sonnewald, AtHsp70-15-deficient Arabidopsis plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV, *Plant J.* 66 (2011) 983–995.
- [47] N. Chen, Q. Yang, D. Hu, L. Pan, X. Chi, M. Chen, et al., Gene expression profiling and identification of resistance genes to low temperature in leaves of peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Sci. Hortic.* 169 (2014) 214–225.
- [48] P.A.V. Thangella, S.N.B.S. Pasumarti, R. Pullakhandam, B.R. Geereddy, M.R. Daggi, Differential expression of leaf proteins in four cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under water stress, *3 Biotech.* 8 (2018) 157.
- [49] A. Mangeon, R.M. Junqueira, G. Sachetto-Martins, Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily, *Plant Signal. Behav.* 5 (2010) 99–104.
- [50] J. Gómez, D. Sánchez-Martínez, V. Stiefel, J. Rigau, P. Puigdomènech, M. Pagès, A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein, *Nature* 334 (1988) 262–264.
- [51] A.P. Chen, N.Q. Zhong, Z.L. Qu, F. Wang, N. Liu, G.X. Xia, Root and vascular tissue-specific expression of glycine-rich protein AtGRP9 and its interaction with AtCAD5, a cinnamyl alcohol dehydrogenase, in *Arabidopsis thaliana*, *J. Plant Res.* 120 (2007) 337–343.
- [52] J.A. Huerta-Ocampo, M.F. León-Galván, L.B. Ortega-Cruz, A. Barrera-Pacheco, A. De León-Rodríguez, G. Mendoza-Hernández, et al., Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.), *Plant Biol (Stuttg.)* 13 (2011) 472–482.
- [53] L.M. Yao, Y.N. Jiang, X.X. Lu, B. Wang, P. Zhou, T.L. Wu, Overexpression of a glycine-rich protein gene in *Lablab purpureus* improves abiotic stress tolerance, *Genet. Mol. Res.* 15 (2016).
- [54] C. Schmitz-Linneweber, M.K. Lampe, L.D. Sultan, O. Ostersetzer-Biran, Organellar maturases: a window into the evolution of the spliceosome, *Biochim. Biophys. Acta* 1847 (2015) 798–808.
- [55] R. Zoschke, M. Nakamura, K. Liere, M. Sugiura, T. Börner, C. Schmitz-Linneweber, An organellar maturase associates with multiple group II introns, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 3245–3250.
- [56] S. Malik, K.C. Upadhyaya, S.M.P. Khurana, Phylogenetic analysis of nuclear-encoded RNA maturases, *Evol. Bioinforma.* 13 (2017) 1176934317710945.
- [57] W. Xu, H. Lv, M. Zhao, Y. Li, Y. Qi, Z. Peng, et al., Proteomic comparison reveals the contribution of chloroplast to salt tolerance of a wheat introgression line, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32384.
- [58] X. Xiao, L.-T. Yang, Y.-B. Lu, H. Li, S.-Q. Zhang, L.-S. Chen, Proteomic changes of citrus roots in response to long-term manganese toxicity, *Trees* 28 (2014) 1383–1399.
- [59] X. Xiao, F. Yang, S. Zhang, H. Korpelainen, C. Li, Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress, *Physiol. Plant.* 136 (2009) 150–168.
- [60] C. Molina, B. Rotter, R. Horres, S.M. Udupa, B. Besser, L. Bellarmino, et al., SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots, *BMC Genomics* 9 (2008) 553.
- [61] D.T. Le, R. Nishiyama, Y. Watanabe, M. Tanaka, M. Seki, L.H. Ham, et al., Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis, *PLoS One* 7 (2012) e49522.
- [62] F. Yin, C. Qin, J. Gao, M. Liu, X. Luo, W. Zhang, et al., Genome-wide identification and analysis of drought-responsive genes and microRNAs in tobacco, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 5714–5740.
- [63] L.B. Poersch-Bortolon, J.F. Pereira, A. Nhani, H.H.S. Gonzáles, G.A.M. Torres, L. Consoli, et al., Gene expression analysis reveals important pathways for drought response in leaves and roots of a wheat cultivar adapted to rainfed cropping in the Cerrado biome, *Genet. Mol. Biol.* 39 (2016) 629–645.
- [64] S. Hussain Syed, A. Kayani Mahmood, M. Amjad, Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants, *Biotechnol. Prog.* 27 (2011) 297–306.
- [65] R. Joshi, S.H. Wani, B. Singh, A. Bohra, Z.A. Dar, A.A. Lone, et al., Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1029.

RESEARCH ARTICLE

Root Transcriptome Analysis of Wild Peanut Reveals Candidate Genes for Nematode Resistance

Patricia M. Guimaraes^{1*}, Larissa A. Guimaraes¹, Carolina V. Morgante², Orzenil B. Silva, Jr¹, Ana Claudia G. Araujo¹, Andressa C. Q. Martins³, Mario A. P. Saraiva¹, Thais N. Oliveira³, Roberto C. Togawa¹, Soraya C. M. Leal-Bertioli¹, David J. Bertioli³, Ana Cristina M. Brasileiro¹

1 EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia, DF, Brazil, **2** EMBRAPA Semi-Arid, Petrolina, PE, Brazil, **3** University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

* patricia.guimaraes@embrapa.br



OPEN ACCESS

Citation: Guimaraes PM, Guimaraes LA, Morgante CV, Silva OB, Jr, Araujo ACG, Martins ACQ, et al. (2015) Root Transcriptome Analysis of Wild Peanut Reveals Candidate Genes for Nematode Resistance. PLoS ONE 10(10): e0140937. doi:10.1371/journal.pone.0140937

Editor: Niranjana Baisakh, Louisiana State University Agricultural Center, UNITED STATES

Received: June 2, 2015

Accepted: September 30, 2015

Published: October 21, 2015

Copyright: © 2015 Guimaraes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: This Transcriptome Shotgun Assembly project (TSA) has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession GDBK00000000 (PRJNA284674). The version described in this paper is the first version, GDBK01000000.

Funding: EMBRAPA (www.embrapa.br) and CNPq-PRONEX (<http://www.cnpq.br>) contributed to funding this work with financial support and sponsorships. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Wild peanut relatives (*Arachis* spp.) are genetically diverse and were adapted to a range of environments during the evolution course, constituting an important source of allele diversity for resistance to biotic and abiotic stresses. The wild diploid *A. stenosperma* harbors high levels of resistance to a variety of pathogens, including the root-knot nematode (RKN) *Meloidogyne arenaria*, through the onset of the Hypersensitive Response (HR). In order to identify genes and regulators triggering this defense response, a comprehensive root transcriptome analysis during the first stages of this incompatible interaction was conducted using Illumina Hi-Seq. Overall, eight cDNA libraries were produced generating 28.2 GB, which were *de novo* assembled into 44,132 contigs and 37,882 loci. Differentially expressed genes (DEGs) were identified and clustered according to their expression profile, with the majority being downregulated at 6 DAI, which coincides with the onset of the HR. Amongst these DEGs, 27 were selected for further qRT-PCR validation allowing the identification of nematode-responsive candidate genes that are putatively related to the resistance response. Those candidates are engaged in the salicylic (NBS-LRR, lipocalins, resveratrol synthase) and jasmonic (patatin, allene oxidase cyclase) acids pathways, and also related to hormonal balance (auxin responsive protein, GH3) and cellular plasticity and signaling (tetraspanin, integrin, expansin), with some of them showing contrasting expression behavior between *Arachis* RKN-resistant and susceptible genotypes. As these candidate genes activate different defensive signaling systems, the genetic (HR) and the induced resistance (IR), their pyramiding in one genotype via molecular breeding or transgenic strategy might contribute to a more durable resistance, thus improving the long-term control of RKN in peanut.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Peanut (*Arachis hypogaea*) is the fourth most important oil crop in the world and is a major source of edible oil and digestible protein, especially in Asia, Africa and Americas. This crop also has a significant role in sustainable agriculture in terms of global food security and nutrition, fuel and energy, sustainable fertilization, and enhanced agricultural productivity as a rotation crop [1]. The narrow genetic base of the cultivated gene pool together with the tetraploid and complex nature of the genome are a challenge to breeding efforts to develop cultivars with multiple resistances, high quality and yield [2]. Diversely, peanut diploid wild relatives (*Arachis* spp.) are important sources of resistance genes due to their higher genetic diversity, and because they have been selected during evolution in a range of environments and biotic stresses, constituting a rich source of new alleles to be introgressed into the cultivated species [3].

Peanut yield is worldwide affected by fungi, bacteria, virus and the root-knot nematode (RKN) *Meloidogyne arenaria*, which causes substantial yield losses at relatively low population densities [4]. The current approach to manage *M. arenaria* in the crop include chemical control, adequate cultural practices and most recently, the use of resistant cultivars, which once integrated with good pest management practices, can reduce the risk of pest outbreaks and the expense and environmental toxicity of nematicides [5]. Up to now, three peanut nematode resistant cultivars (COAN, Nematan and Tifguard) have been developed, all by the introgression of a chromosome region from the wild diploid species *A. cardenasii* [6, 7], for which recently, tightly linked genetic markers have been developed [4, 8]. Whilst quantitative sources of resistance to RKN have been found in peanut, strong resistance probably derived from a small number of genes, such as displayed by Hypersensitive Reaction (HR), has only been identified in diploid species [9, 10]. Therefore, the identification of novel genes related to plant defense against RKN in wild *Arachis* species is desirable, to broaden the sources of resistances deployed in peanut, and also secure greater durability of the resistance.

Resistance to RKN in various species is often mediated by HR, which occurs soon after invasion and is characterized by the generation of reactive oxygen species (ROS) in plant root cells associated with the presence of second stage juveniles (J2), with the *Mi-1*-mediated resistance in tomato being the most well characterized [11]. In previous studies [10], we showed that the wild peanut relative *A. stenosperma* is resistant to *M. arenaria*, with its mechanism of resistance operating in at least two stages: firstly, only few nematodes intrude the resistant roots, and then, those that successfully penetrated, were killed by HR in the surrounding cells. Transcriptional profiling studies in this species have identified a number of genes potentially related to this defense response [12–14]. Nevertheless, the molecular events and the functional role of these genes are yet to be clarified. In this regard, high-throughput mRNA sequencing (RNA-Seq) can be a complementary strategy to predict the roles and interactions of genes, and help the elucidation of complex signaling pathways activated in response to nematode parasitism. This technique enables a comprehensive transcriptome survey of induced changes in gene expression, and has already been successfully applied for the identification of genes responsive to diverse biotic and abiotic stresses, or during specific developmental stages in peanut [2, 15–17].

In this work, a genome-wide overview of gene expression during the first stages of the incompatible *A. stenosperma*/*M. arenaria* interaction was obtained using RNA-Seq, aiming to better understand the ways in which the resistant host transcriptome respond to the attack of this endoparasite and identify novel genes potentially involved with this nematode resistance. This approach provided new insights into the defense mechanisms used by this species to avoid infection and the ultimate development of the HR response. The understanding of these mechanisms and genes underlying this response will facilitate their transference to more

adapted cultivars through the use of tightly linked genetic markers or via plant transformation, leading to improved peanut varieties with higher and more durable resistance to RKN.

Material and Methods

Plant material and libraries construction

A. stenosperma (accession V10309) plants challenged with *M. arenaria* race 1 were obtained as described before [14]. Shortly, plants were maintained under greenhouse conditions at the University of California, Riverside, USA, and approximately 20,000 juveniles of *M. arenaria* (J2) were resuspended in 1 ml of fresh deionised water and pipetted into soil depressions around each root of the 4-week-old plants. Control roots were collected at day zero and inoculated roots were collected at 3, 6 and 9 days after inoculation (DAI) in liquid nitrogen for total RNA extraction, using the lithium chloride modified protocol [18], and then purified using Invisorb Plant RNA Mini Kit (Invitex, Germany). Equal amounts of total RNA per collecting point (control and 3, 6 and 9 DAI) were pooled from five different plants, forming four combined samples with two independent biological replicates each. For the paired-end cDNA libraries construction and sequencing, services of FASTERIS (www.fasteris.com) were used employing the mRNA-seq and TruSeq (TM) SBS v5 protocols (Illumina, USA) on a Hi-Seq 2000 sequencing system.

Sequence processing and analysis

The *de novo* contig assembly of *A. stenosperma* reads was performed by FASTERIS using Velvet assembler (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>) that takes in short read sequences removes errors and produces high quality unique contigs, followed by its additional module specialized in transcriptome assembly, OASES, which allows ambiguity assembly, such as alternative splicing or polymorphism (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/oases/>). To validate the *de novo* assembly and estimate the number of assembled reads, a BWA mapping (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) was carried on with the *de novo* contigs for the best assembly selected, using 1 million pairs of each library. A complete mapping was only carried for the best selected assembly. The coverage of each transcripts of the best oases assembly was computed using the BEDtools software (<http://code.google.com/p/bedtools>).

Differential expression analysis of contigs was performed with DESeq package (<http://www.bioconductor.org/biocLite.R>) using the contig count matrix built from the Bedtools coverage output. Scaling factor for each given sample in each performed pairwise treatment-control was computed using the “estimateSizeFactors” function. Dispersion estimate call was performed with the “estimateDispersions” function from DESeq package for null model evaluation with few replicates with parameters method = “pooled”, fitType = “parametric” and sharingMode = “fit-only”. The read counts for each contig in each treatment-control condition were fitted to a negative binomial (NB) distribution via the “nbinomTest”- algorithm that involves borrowing information from count data for the complete set of genes. Transcript abundance for each gene was then inferred from the NB mean, in combination with a normalisation obtained by matching the distribution of read counts over a subset of genes which are likely not to be Differentially Expressed Genes (DEGs) according to the model fit. Thus, the null hypothesis corresponding to no differential expression is that the transcript abundance is the same in both conditions. P-values for each estimate of False Discovery Rates (FDRs) were added using the Benjamini-Hochberg algorithm.

For each time point (3, 6 and 9 DAI), the number of DEGs in the infected libraries was compared to the control samples to estimate the Fold Change (FC). Genes were considered as significant DEGs when their relative gene expression levels showed at least 4-FC ($\log_2\text{FC} \geq 2.0$ or

≤ -2.0) difference between inoculated and control samples, with P -value < 0.05 . Clustering analysis of the significant DEGs based on common expression patterns was conducted using the Multiexperiment Viewer (MeV) (<http://www.tm4.org/mev.html>). K-means clustering was performed using TM4: MeV 4.7 software (<http://www.tm4.org/mev.html>) and Pearson's correlation coefficient.

Similarity search and functional annotation

Functional annotation of contigs was performed by sequence similarity searches using BLASTX against NCBI's non-redundant sequence database, and similarities were considered significant with E -values $\leq 1e-7$ (S1 Table). InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) was employed to perform protein domain and motif searches. Gene ontology (GO) terms were assigned by Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>). *A. stenosperma* putative Transcription Factors (TFs) were identified from the functional BLASTX annotation, and classified according to their TF family using KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

For the MapMan ontology, all *A. stenosperma* DEGs were compared to *Glycine max* Affymetrix chip (<http://soybase.org/AffyChip/>), using BLASTN (E -values $\leq 1e-7$) default parameters. Only *A. stenosperma* DEGs with identity hits higher than 70% were used for the analysis, and to compile a MapMan ontology (<http://mapman.gabipd.org/>) classification. Pictorial representations for the biotic stress pathways were uploaded from the MapMan website.

Expression analysis by qRT-PCR

For qRT-PCR analysis, the Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix-UDG w/ROX kit (Invitrogen, USA) was used according to manufacturer's recommendations on ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem Foster City, USA). *A. stenosperma* RNA samples were reassembled in pools of five random individuals with two independent biological replicates formed per collecting point (control and 3, 6 and 9 DAI). A total of 2 μ g of each RNA pool was treated with 2 U of DNase (Fermentas, Germany) and reverse transcribed using the Super Script II enzyme and oligo(dT) 20 primer (Invitrogen, USA), according to manufacturer's instructions. Specific primer pairs were designed for the selected candidate genes (S2 Table) and PCR reactions carried out as previously described [14]. Average cycle threshold (Cq) values were estimated using the online real-time PCR Miner tool [19] and normalized to two reference genes (*As60S* and *AsGAPDH*), as previously established [18]. Expression ratios of mRNA transcripts at 3, 6 and 9 DAI, relative to control were determined and statistically tested using REST 2009 ver. 2.0.13 software [20]. For qRT-PCR analysis using contrasting genotypes, a new bioassay was conducted in greenhouse conditions essentially as described above using *M. arenaria* resistant *A. stenosperma* (V10309) and susceptible *A. hypogaea* cv Runner. Total RNA from control and 6DAI inoculated roots were assembled in pools of three individuals to form two biological replicates per treatment.

Results and Discussion

RNA-sequencing and *de novo* assembly

Non-inoculated and *M. arenaria* race 1 inoculated (3, 6, 9 DAI) *A. stenosperma* roots were collected for total RNA extraction. Two biological replicates per collecting point were subsequently formed by pooling total RNA samples. The eight cDNA libraries constructed were pair-ended sequenced using Illumina Hi-Seq 2000, with two technical replicates for each library, in two different sequencing runs. A total of 141.3 million raw reads was produced, constituting 28.2 GB of cDNA sequences. An overview on the data of the RNA-seq experiment

Table 1. Summary of the *A. stenosperma* Illumina Hi-Seq sequencing data.

Library	Total number reads	≥ Q30 ^a (%)a	Raw reads (%)	Number contigs	Mapped Reads (%)
3 DAI—1	23,015,612	93.9	16.2	41,523	35.0
3 DAI—2	15,466,334	94.5	10.9	40,648	39.9
6 DAI—1	14,229,647	95.3	10.3	36,749	36.0
6 DAI—2	20,684,933	95.6	14.6	37,926	35.6
9 DAI—1	15,294,055	95.0	10.8	37,061	39.0
9 DAI—2	16,126,462	95.2	11.4	37,077	37.7
CTR—1	15,994,785	94.6	11.3		36.6
CTR—2	20,517,124	95.1	14.5	8,581	35.5
Total	141,328,952				

^a(Q30) 1 in 10³ error in base calling

doi:10.1371/journal.pone.0140937.t001

and contig mapping in the best *de novo* assembly is shown in [Table 1](#) and [S1 Fig](#). This Transcriptome Shotgun Assembly project (TSA) has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession GDBK00000000 (PRJNA284674). The version described in this paper is the first version, GDBK01000000.

The *de novo* transcript assembly consisted of 37,882 loci which include a combined total of 44,132 contigs ([S1 Table](#)). In total 3,548 of the loci had multiple contigs consisting of different combinations of splice variants or different regions of the same loci due to partial assembly. Most contigs were 200–300 bp in length, with more than 37,000 contigs common among all libraries ([S1 Fig](#)). Overall, 34,489 sequences (78.14%) showed similarity to proteins in the NCBI databank using BLASTX algorithm (E value < e-7) ([S1 Table](#)). The number of loci assembled for *A. stenosperma* with gene structure found herein, is comparable to those described in other tropical legumes such as soybean (43,367) [[21](#)], chickpea (42,141) [[22](#)], pigeonpea (48,680) [[23](#)] and common bean (39,572) [[24](#)].

To date, publicly available transcriptome data for *A. stenosperma* comprise 6,264 ESTs and 7,723 contigs originated from a Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) both produced by this group [[25](#), [26](#)]. In this study, the sequencing of root samples during the early stages of the *A. stenosperma*/RKN interaction, associated to the robustness of the Illumina Hi-Seq technique, enabled a 3-fold increase on the number of loci identified for this species, which is known to harbor resistance to a number of pests but lacks a reference genome sequenced. This study will, therefore, expand considerably the transcriptomic resources available to be used for gene discovery, molecular genetics and functional genomics in the genus *Arachis*.

Functional annotation

The annotation of the *A. stenosperma* contigs and their assignment into functional categories based on conserved PFAM domain predictions and gene ontology (GO) allowed the classification of almost 30% (13,157) of the 44,132 contigs in the three main GO categories: biological process (41.59%), molecular function (33.74%) and cellular component (24.66%) ([Fig 1](#)). This distribution was in accordance with previous analysis on peanut and wild *Arachis* transcriptome [[16](#), [26–28](#)], with proteins related to metabolic processes (15%) and cellular processes (12%) enriched in the biological process, whilst cell (8%) and cell parts (7%) were the most highly represented in the cellular components category. Interestingly, within the molecular function category, binding proteins (14%) and proteins related to catalytic activity (11%) were the most enriched, with only 207 contigs annotated in the response to stimulus category (0.5%)

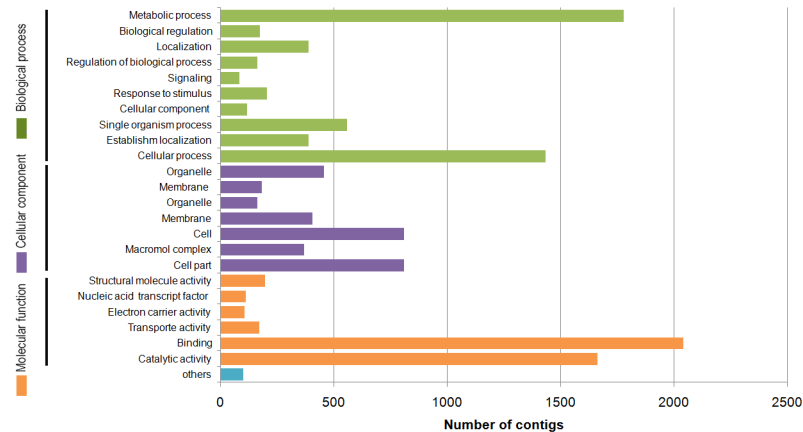


Fig 1. Gene Ontology (GO) terms of *A. stenosperma* transcriptome during the interaction with *M. arenaria*.

doi:10.1371/journal.pone.0140937.g001

(Fig 1). This included genes with putative defense function regulated during RKN infection, such as peroxidases, chitinases, extensins and proteinase inhibitors, perhaps playing a global response to pathogen invasion or specific response to the nematode, including serine–threonine protein kinases and glycosyltransferases [29]. Genes related to regulation of hormones, such as auxin repressed proteins (ARP) and cytokinin oxidase, previously related to *A. stenosperma* response to *M. arenaria* were also identified [14, 30].

Transcription factors distribution

Transcriptional factors (TFs) are of foremost importance, as gene induction by stress occurs primarily at the level of transcription. TFs regulation of the temporal and spatial expression of these genes is an important part of downstream signaling pathways to initiate protective stress responses, as seen in peanut and other legumes [31–33]. *A. stenosperma* TFs here identified were classified into 23 families according to KEGG, and those related to biotic stress response were amongst the most abundant, including MYB (22%), EREBP (13%), bZIP (12%), HD-ZIP (10%), Heat shock (9%), Zinc finger (8%), CCAAT binding (7%) and WRKY (2%) (Fig 2).

The three most expressed TF families in this study MYB, EREBP and bZIP, which are implicated in many cell physiological and biochemical processes, have also been described as being involved in different plant-pathogen interactions, through the regulation of pathogen resistance and cell death [33]. Thus, it is possible that the TFs highly expressed here have closely overlapping functions, and might activate or repress genes through cis-acting sequences that respond to the nematode infection.

Clustering analyses of the differentially expressed genes

Differential expression of *A. stenosperma* contigs was achieved with DESeq package that performs variance estimation and differential expression of the raw read counts, using the contig count matrix built from the Bedtools coverage output. Therefore, at each sampling point, the number of differentially expressed genes (DEGs) in the infected libraries was compared to the control (Fold Change-FC). Genes were considered to be differentially expressed when relative gene expression levels showed at least 4-FC difference ($\log_2FC \geq 2.0$ or ≤ -2.0) between inoculated and control samples, with and P-value < 0.05. In total, 958 (2.17%) significant DEGs were identified among the 44,132 contigs in at least one of the sampling points (3, 6 or 9 DAI),

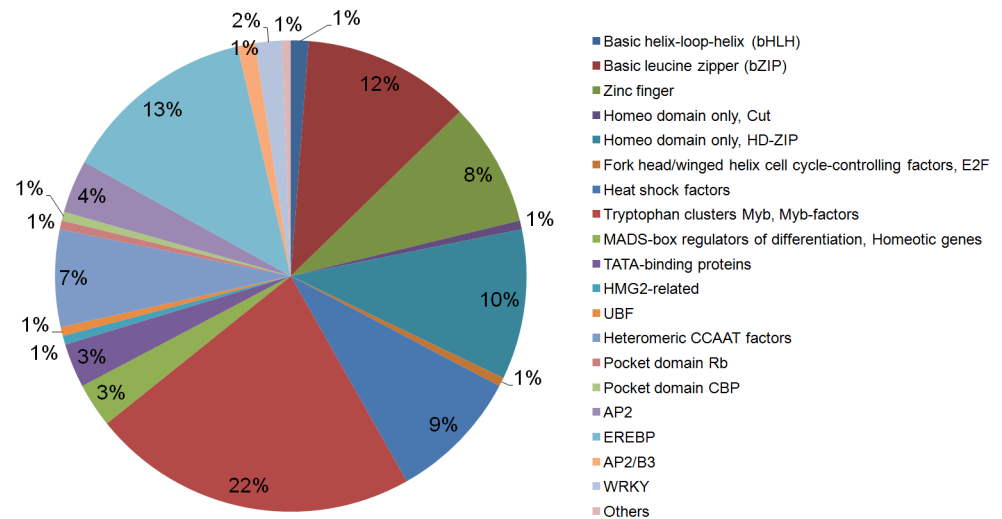


Fig 2. Distribution of *A. stenosperma* Transcription Factors families during the interaction with *M. arenaria*.

doi:10.1371/journal.pone.0140937.g002

indicating that, the great majority of contigs were evenly expressed between inoculated and control roots during the assay time course.

A Heat Map representation of the clustering analysis of the global expression of these DEGs indicated a general downregulation during the initial time points of the *M. arenaria* infection (Fig 3A). Numbers of DEGs greatly differed at each stage of this plant-pathogen interaction and point up to a considerable imbalance of gene expression during nematode infection. At 3 DAI, the majority of DEGs (268) were downregulated in *A. stenosperma* infected roots, whilst 165 were upregulated. The profile changed more drastically at 6 DAI, when the number of downregulated DEGs (473) is 52-fold higher than that of upregulated genes (9). At subsequent stage (9 DAI), most of the genes (91) was still repressed, and only few (13) were induced. This global gene downregulation at early stages of RKN interaction is in agreement with the expression profiles previously reported for peanut and *A. stenosperma* [30, 34], as well as for other legumes.

The expression trends at the early stages of *M. arenaria*/*A. stenosperma* interaction were corroborated by subsequent MeV clustering analysis ($P < 0.05$ and $\log_2FC \geq 2.0$ or ≤ -2.0), which gathered the 958 significant DEGs into three distinct clusters based on common expression patterns (Fig 3A and 3B). Cluster I grouped 284 DEGs downregulated at 3 DAI, with a slight upregulation at 6 and 9 DAI (Fig 3B). Contrastingly, Cluster II showed 44 DEGs which were induced only at 3 DAI, followed by a steady downregulation at the two other points. The larger group, Cluster III, was composed of 630 DEGs displaying an upregulation only at 3 DAI, followed by a strong downregulation at 6 and 9 DAI. Representatives of each cluster were selected for further validation of their expression profile using qRT-PCR.

Regardless the trend of the expression pattern (up or down), the great majority of genes showed differential regulation at 6 DAI (482), followed by 3 DAI (433) and 9 DAI (104), with 61 showing significant regulation in more than one sampling point. Most commonly regulated genes were identified between 6 and 9 DAI, with few in common to 3 DAI, as most DEGs were downregulated at 6 and 9 DAI, but upregulated at 3DAI (Fig 3A and 3B).

Several studies, including those in *Arachis*, have identified genes responsive to nematode infection, in both, the compatible and incompatible interactions, which regulation vary dramatically due to, among other factors, the time elapsed since pathogen perception [30, 34 35].

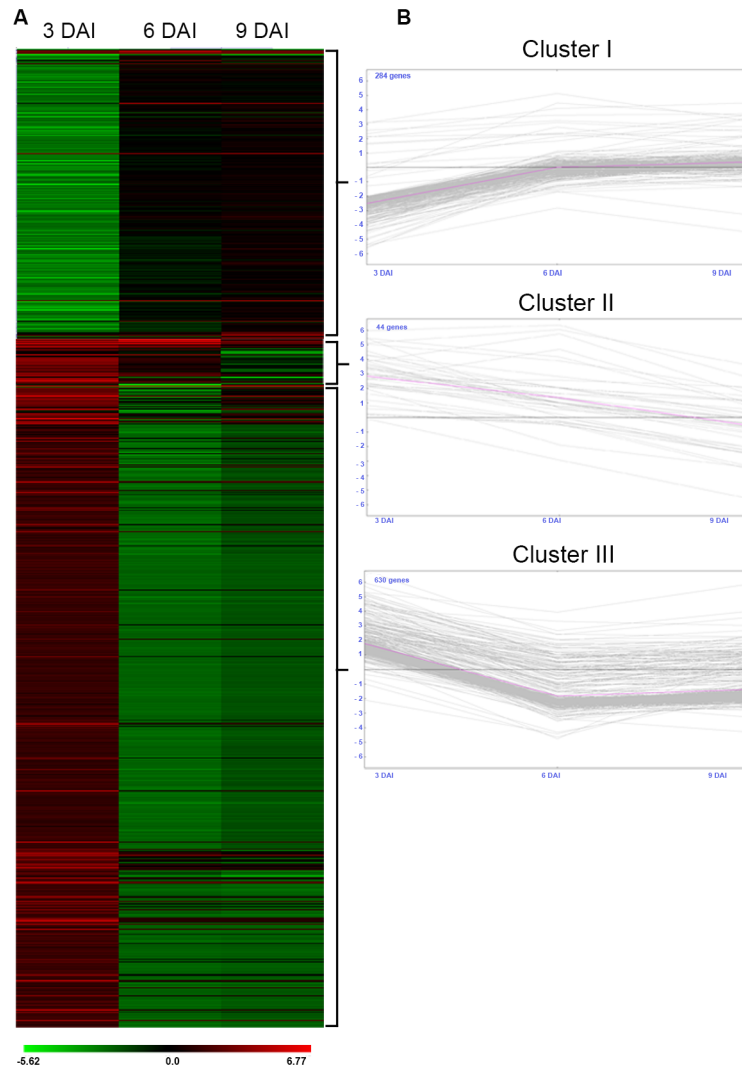


Fig 3. HeatMap of *A. stenosperma* Differentially Expressed Genes (DEGs). A) Distribution of *A. stenosperma* DEGs significantly ($FC \geq 2.0$ or ≤ -2.0 and $p < 0.05$) up and downregulated during *M. arenaria* infection with in at least one of the sampling points (3, 6 or 9 DAI). Normalised values, relative to control, are shown in a red–green scale; the brightest red being the most upregulated and the brightest green, the most downregulated genes; B) DEGs K-means clustering analysis, with the pink lines indicating the representative expression profile of the Cluster; x- axes represent days after nematode inoculation (DAI) and y-axes, log₂FC of mRNA levels of DEGs in the sampling points (3, 6 or 9 DAI) normalized to control.

doi:10.1371/journal.pone.0140937.g003

In the resistant *A. stenosperma*, the great majority of genes are repressed in response to the infection, which is in accordance to studies on other plant-RKN interactions [35–37], and on the soybean cyst nematode [38]. This suggests that the downregulation of a significant number of genes might be necessary for the onset of the specific HR in *A. stenosperma*, as in other resistant genotypes, which is the main mechanism of resistance to *M. arenaria* [10, 39].

MapMan ontology

In order to obtain an overview of the metabolic pathways or other processes underlined by the 958 DEGs, we used the MapMan tool [40]. For that, due to the lack of an Affymetrix chip containing *Arachis* spp. sequences, only *A. stenosperma* DEGs displaying sequence identity higher

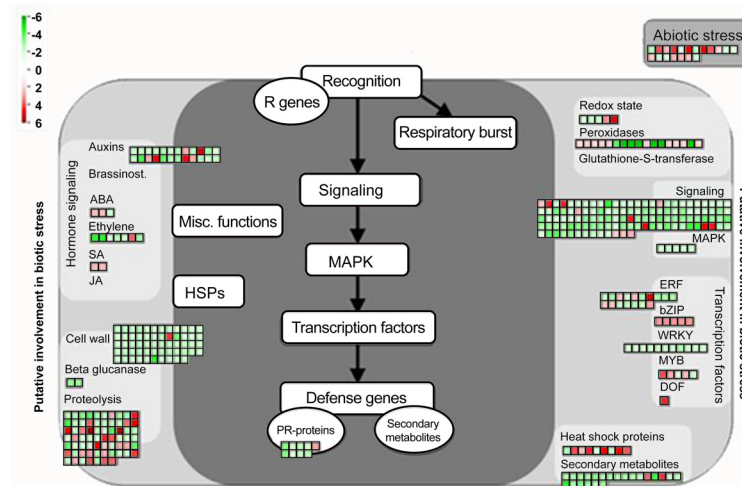


Fig 4. MapMan visualization of *A. stenosperma* genes involved in the response to *M. arenaria* infection. Overview of DEGs expression patterns (\log_2FC of mRNA levels) in infected roots relative to control. Dots show the different paralogous genes encoding proteins that are related to a certain defense response step. Red dots indicate upregulation and green dots downregulation.

doi:10.1371/journal.pone.0140937.g004

than 70% with the *G. max* Affymetrix chip sequences were considered for the analysis. A total of 405 genes (42.27%) with sufficient homology to the *G. max* genome probes were annotated into 20 MapMan Bins. A diagram displaying the expression of these DEGs into biotic stress pathways and processes is shown in Fig 4. Using MapMan annotation software to organize and display our data sets in the context of biological pathways we found 345 genes related to biotic stress responses among distinct DEGs, with a large number of genes involved in signaling (114), including 39 TFs. Interestingly, those TF genes revealed in MapMan analysis belong to TF families, as MYB, EREBP and b-ZIP (Fig 4), that are also the most abundant families previously identified in the TF distribution analysis (Fig 2). Also, genes related to pathogen recognition and defense response (9), cell wall modification (58), hormonal metabolism (36) and proteolysis (67), enzymes of the phenylpropanoid pathway and others related to secondary metabolites (22), which are well known to be involved in the defense response to nematode infection, could be mapped (Fig 4).

Overall, MapMan ontology enabled a genome-wide expression outline of *A. stenosperma* genes responding to *M. arenaria* infection, by identifying pathways that are involved in the main steps leading to the HR response. Initially, pathogen recognition by R genes (Fig 4) triggers Effector-Triggered Immunity (ETI), eliciting reactive oxygen intermediates and ion fluxes (redox state species and peroxidases) and also enzymes that protect the cell from the attack by reactive oxygen (e.g. Glutathione-S-transferase). Following, the upregulation of genes engaged in signal transduction pathways (e.g. ERF, b-ZIP, MYB) promote the induction of a large set of genes commonly known as defense related genes (e.g. Heat Shock Proteins, Proteolytic proteins), Pathogenesis related proteins (PR) and enzymes involved in the synthesis of anti-microbial compounds called phytoalexins (secondary metabolites). Genes involved in phytohormone signaling pathway directly related to plant defense response (Jasmonic acid (JA), Salicylic Acid (SA)) and others that play a role in plant immunity (ABA and Auxin) were also upregulated (Fig 4). Some of the proteins and transcription factors regulated here are also known to be activated by environmental factors (abiotic stress), whilst PAMP-triggered immunity (PTI) activated by pathogen associated molecular patterns (PAMPs), activate cell wall enzymes, induce proteolysis and transcriptional reprogramming as a common plant immune responses (Fig 4).

Genes expression profiling

From the 958 DEGs identified, representatives of each cluster (5%) identified in MeV cluster (Fig 2) were selected as candidate genes for expression profile validation by qRT-PCR. Within each cluster, candidate genes were chosen based on their fold-change level (FC), (positive- or negatively regulated), assuming that those with the highest fold-change ratio would be more likely to have a biological role in this plant-nematode interaction, and also based on their homology in BLASTX to proteins with a functional role in plant defense mechanisms. From those, 27 candidate genes showed significant ($P < 0.05$) differential expression in at least one time point by RT-qPCR analysis (Table 2 and S2 Table). Among these candidates, representatives of different steps of the plant defense response, previously identified in MapMan analysis

Table 2. Differentially expressed candidate genes in *A. stenosperma* roots infected with *M.arenaria*.

Gene symbol	Acc ID	Putative gene (BlastX)	Related taxon	E-value
AsALKBH2	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_29780_T_1	Alpha-Ketoglutarate-dependent dioxygenase Homolog 2-like	<i>Cicer arietinum</i>	1,00E-91
AsAOC3	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_517_T_1	Allene Oxide Cyclase 4	<i>Glycine max</i>	2,00E-130
AsAraH8	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_35385_T_1	Ara h 8 allergen	<i>Arachis hypogaea</i>	3,00E-10
AsATPase α	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_1605_T_2	ATP synthase subunit alpha	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-22
AsAUX/IAA	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_13_T_1	Auxin-Responsive protein	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1,00E-78
AsBap	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_33039_T_1	Beta-adaptin-like protein A-like	<i>Glycine max</i>	9,00E-51
AsBger	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_24150_T_1	Beta-glucan-elicitor receptor	<i>Glycine max</i>	1,00E-105
AsBTB	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_26421_T_1	BTB/POZ domain-containing protein	<i>Camelina sativa</i>	2,00E-29
AsCHI2	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_30251_T_1	Class II Chitinase	<i>Arachis hypogaea</i>	4,00E-133
AsCOX1	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_3048_T_7	Cytochrome c oxidase subunit 1	<i>Milletia pinnata</i>	0.0
AsCWAH	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_36188_T_1	Cell wall-associated hydrolase	<i>Rothia dentocariosa M567</i>	7,00E-49
AsCWAH2	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_32291_T_1	Cell wall-associated hydrolase	<i>Medicago truncatula</i>	1,00E-10
AsERF6	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_14392_T_1	Ethylene-Responsive element binding Factor 6	<i>Arachis hypogaea</i>	7,00E-100
AsGH3.1	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_5661_T_1	Probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1	<i>Glycine max</i>	0.0
AsIOMT	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_11970_T_1	Isoflavone 7-O-methyltransferase	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	8,00E-149
AsKEL	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_37157_T_1	Kelch repeat-containing protein-like	<i>Arachis hypogaea</i>	2,00E-56
AsMAN	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_18389_T_1	Mannan endo-1,4-beta-mannosidase 2-like	<i>Glycine max</i>	1,00E-62
AsMYB25	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_5798_T_1	MYB-related protein 25	<i>Arachis hypogaea</i>	4,00E-44
AsNDX1	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_29095_T_1	NDX1 homeobox protein	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-10
AsPRR37	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_934_T_1	Response regulator-like APRR7-like	<i>Cicer arietinum</i>	1,00E-24
AsSAG	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_31635_T_1	Senescence-Associated protein	<i>Medicago truncatula</i>	3,00E-31
AsSLP	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_34699_T_1	Subtilisin-like protease-like	<i>Glycine max</i>	4,00E-44
AsTAT	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_15416_T_1	Tyrosine aminotransferase	<i>Medicago truncatula</i>	4,00E-163
AsTIR-NBS-LRR	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_10567_T_1	TIR NB-ARC LRR protein	<i>Arachis duranensis</i>	4,00E-103
AsTMV	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_19034_T_1	TMV resistance protein	<i>Glycine max</i>	2,00E-39
AsUreD	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_27820_T_1	Urease accessory protein UreD	<i>Medicago truncatula</i>	2,00E-122
AsWRKY49	A_stenosperma_Nema_Hiseq_L_3478_T_2	WRKY49	<i>Glycine max</i>	5,00E-56

doi:10.1371/journal.pone.0140937.t002

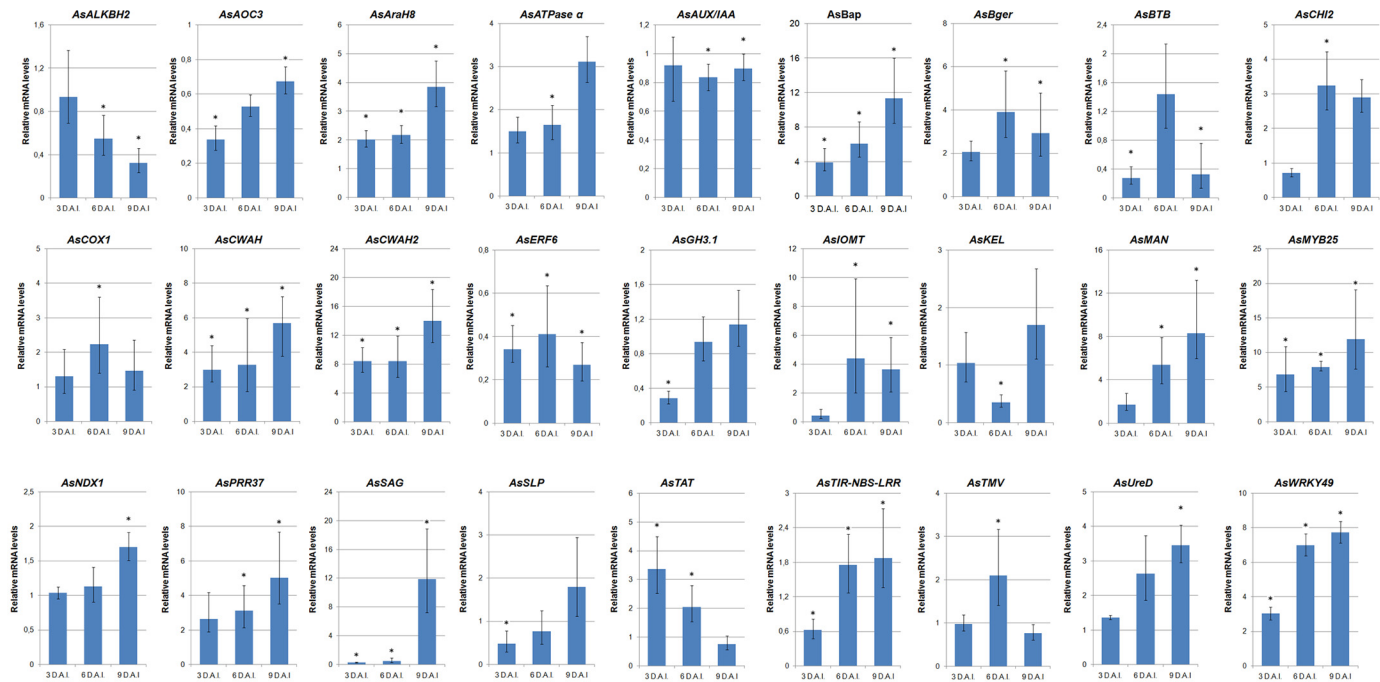


Fig 5. *A. stenosperma* candidate genes expression profile by qRT-PCR. Relative mRNA levels of 27 candidate genes in *A. stenosperma* roots inoculated with *M. arenaria* collected at 3, 6 and 9 days (DAI), relative to control. Bars represent the standard deviation of two biological replicates. Significantly ($P < 0.05$) up- or downregulated genes are indicated *.

doi:10.1371/journal.pone.0140937.g005

(Fig 4), were found, including: (i) genes associated to the perception of PAMPs such as glucan binding proteins (*AsBger*) that perceives beta-glucans from microbes; (ii) enzymes that degrade pathogen cell wall such as chitinases (*AsCHI2*); (iii) resistance genes such as NBS-LRR proteins (*AsTIR-NBS-LRR*) that recognize pathogen effectors and (iv) TFs previously identified *in silico* as the most abundant and related to plant responses to stresses (*AsMYB25*; *AsWRKY49*; *AsERF6*) (Fig 2). In addition, genes codifying for (v) key enzymes on the jasmonic and salicylic acids metabolic pathways, which are triggered as plant responses to pathogen attack, such as ureases (*AsUreD*) and Response Regulator (*AsPRR37*), (vi) enzymes related to Reactive Oxygen Response (ROS), such as allene oxidase (*AsAOC3*) and (vii) enzymes related to hormonal balance (*AsGH3.1*) and (ix) cell wall composition and trafficking, such as two cell wall hydrolases (*AsCWAH* and *AsCWAH2*), were also found to be significantly differentially regulated.

All 27 candidate genes analyzed by qRT-PCR showed specificity of transcript amplification, with high amplification efficiencies (S2 Table). Their mRNA levels in *A. stenosperma* roots inoculated with *M. arenaria* relative to control are shown in Fig 5. The majority of candidate genes (17) displayed a gradual increase in their expression as the nematode infection progressed, achieving a positive regulation at 9 DAI (Fig 5). *AsAOC*, showed an unique profile, as it also increased its expression along the assay but was still negatively regulated at 9 DAI. Their expression profile corresponded to genes previously classified in Cluster I (Fig 3). The opposite expression profile, consisting of a gradual decrease on gene expression along the assay, was observed only for two genes (*AsALKBH2* and *AsTAT*; Fig 5) representatives of Clusters II (Fig 3). For the remaining eight candidate genes (*AsAUX/IAA*, *AsBerg*, *AsBTB*, *AsCHI2*, *AsCOX1*, *AsERF6*, *AsKEL* and *AsTMV*), 6 DAI was the inflection point of the curve representing their expression profiles (U- and V-shaped) (Fig 5), with (*AsAUX/IAA* and *AsKEL*) being representatives of Cluster III.

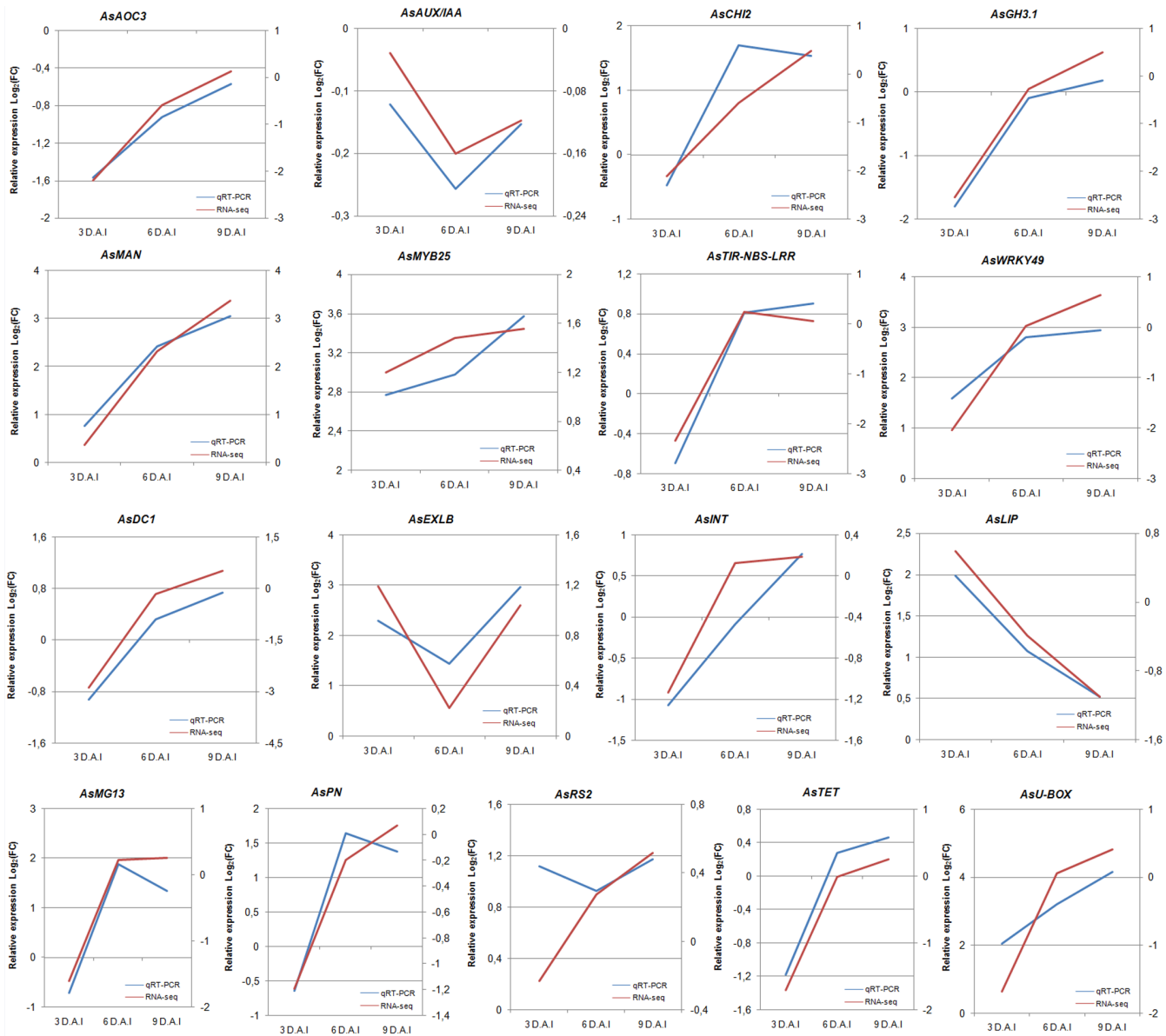


Fig 6. Comparisons between RNA-seq and qRT-PCR expression profile. Log₂ transformed relative mRNA levels of DEGs in roots of *A. stenosperma* inoculated with *M. arenaria* collected at 3, 6 and 9 DAI relative to control, analysed by qRT-PCR (left Y-axis) and by RNA-Seq right Y-axis.

doi:10.1371/journal.pone.0140937.g006

As a follow-up analysis, the expression profiles of these candidate genes by qRT-PCR and *in silico* were compared. For that, graphs displaying the transcript abundance for each contig inferred *in silico* (log₂ transformed relative mRNA levels) and the relative quantification obtained for the corresponding transcript by qRT-PCR (log₂ transformed) were built (Fig 6). An additional set of nine genes previously identified in our studies as interesting candidates for nematode resistance [14, 26] was also included to broaden the analysis (*AsMG13*, *AsU-BOX*, *AsLIP*, *AsDC1*, *AsPN*, *AsINT*, *AsTET*, *AsRS2* and *AsEXLB*) (S3 Table). When primers designed for these additional candidate genes [14] (S3 Table) amplified by electronic PCR more than one contig in our RNA-Seq database, only the contig with the expression profile most similar to the qRT-PCR was considered (Fig 6).

Overall, 17 DEGs showed a comparable expression profile between both analyses, with qRT-PCR results showing to be positively correlated to RNA-Seq data analysis (Pearson correlation coefficients $r = 0.68$). This set of genes exhibited distinctive responses to nematode challenge, and include those related to phytohormones signaling, TFs, cell wall structure and trafficking, which participate in plant resistance to nematodes, including the onset of the HR response, the resistance mechanism described for *A. stenosperma* against *M. arenaria* [10].

The association of their expression profiles in response to nematode infection with their primary functions in defense might contribute to unravel their putative roles during this incompatible plant-nematode interaction, as described below.

Genes involved in the salicylic acid pathway. After perception of pathogen or microbe-associated molecular patterns (PAMPS), which are sensed through leucine-rich repeat (LRR) receptors, plants induce stomatal closure and produce innate immunity responses. If the plant has a specific resistance gene (R) that recognizes the corresponding avirulence (*avr*) gene from the pathogen, a rapid defense mechanism known as the HR occurs to prevent infection. In general, salicylic acid (SA) activates the defense response to biotrophic and hemi-biotrophic pathogens, induces Systemic Acquired Resistance (SAR), and triggers the expression of SAR-associated pathogenesis related genes (PRs). SA has already been described as playing an important role in decreasing susceptibility to RKN, as it can cause accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS), which is observed during the early stages of incompatible interactions and it is one of the components of the HR reaction [41–43].

From the relatively few endoparasite nematode resistance (Nem-R) genes isolated so far, the vast majority fall into the NBS-LRR class of R-genes, including the *MI* gene from tomato, which confers resistance to *M. incognita* and *M. javanica* and five *Me* genes in pepper, that control different species of *Meloidogyne* [39, 44, 45]. In the *A. stenosperma*/*M. arenaria* interaction, several typical cell features, including densely stained cytoplasm and altered organelle structures were observed in the central cylinder, indicating a R-gene mediated HR of infested host cells [10]. In the present study, two members of the NBS-LRR class of R-genes, *AsTIR-NBS-LRR* and *AsMG13* showed an increased level of expression in *A. stenosperma* roots, in concert with the onset of the HR response, what suggests their involvement in the early stages of defense response in this incompatible interaction (Fig 6). R-genes might detect directly the pathogen avirulence effector or recognize changes in the host protein elicited by the pathogen effector (guard hypothesis) [46], and can be used in combinations to be deployed in cultivars to maximize their durability against pathogen changes. The identification of new distinct R genes is, therefore, an important topic in most crop improvement programmes, and *AsTIR-NBS-LRR* and *AsMG13* constitute, thus, interesting candidate genes for further functional characterization.

High levels of SA that often lead to HR are regulated by other proteins, such as lipocalins, which are involved in modulating tolerance to oxidative stress [47]. These proteins have already shown to act as scavengers of potentially harmful molecules known to be induced by extreme temperature stress and excessive light [48]. In our study, the lipocalin *AsLIP* gene expression is induced after nematode perception (3 DAI) following by a sharp reduction on its expression along the assay (Fig 6), which might contribute to the outbreak of the HR in this species. In our previous studies, another known ROS plant scavenger, a metallothionein homolog (*AsMET*) also had its expression diminished during the *A. stenosperma*/*M. arenaria* interaction [30], reinforcing the potential role of these molecules in this defense mechanism.

Salicylic acid is a known secondary metabolism inducing agent, including the phenylpropanoid pathway that, on its turn, produces a variety of structural and defense-related phenolics including resveratrol [49]. Resveratrol Synthase (RS) mediates the synthesis of resveratrol and is induced by different stresses, [48] constituting an important regulator for initiation of HR-related cell death [50]. Peanut is one of the few crop plants that is able to synthesize resveratrol

and the accumulation of RS and its mRNA has been previously observed in wild *Arachis* in response to treatment with ultraviolet light [51]. In our previous studies [14], the RS homolog *AsRS2*, showed upregulation along the nematode infection (3, 6 and 9 DAI), whilst here, similar trend was observed *in silico* at 6 and 9 DAI (Fig 6), both coinciding with the occurrence of HR in *A. stenosperma*. Together with other genes involved in the SA pathway described here, *AsRS2* is suggested to be involved in the HR response of *A. stenosperma* to *M. arenaria*.

In addition to this immediate, gene-a-gene contest, plants also employ general resistance mechanisms induced after the HR to combat secondary infections from a broad spectrum of pathogens, known as systemic acquired resistance (SAR). This mechanism is commonly associated with activation of genes that code for defense related proteins, including chitinases, that have been shown to degrade chitinous components of eggs of *M. incognita* causing a significant reduction on their development and reproduction rate [52]. Here, we found a chitinase homolog (*AsCHI2*) upregulated at 6 and 9 DAI (Fig 6), which we suggest as having a part on the SAR response of *A. stenosperma* to the pathogen.

Genes involved in the jasmonic acid pathway. Besides the genetic resistance mediated by R-genes, induced resistance (IR), activated under the influence of metabolites of plant pathogens and various biotic and abiotic factors called elicitors also occurs. Jasmonic acid (JA) and ethylene are important for the induction of nonspecific disease resistance, and play an important role in IR activating genes that are involved in plant defense in response to wounding and pathogen attack [53]. Jasmonates are closely associated with the production of secondary metabolites, such as flavonoids, and can also trigger synthesis of a wide range of defensive proteins in roots, which are toxic to nematodes *in vitro*, and have been implicated in plant defense against these parasites [54]. One of these compounds are Patatin-like proteins, that play an essential role in HR and cell death during plant-pathogen interactions, as these proteins mediate the production of JA and defense responses in some species [55]. Previous works have shown the upregulation of patatin in response to *M. arenaria* infection in *Arachis* spp. [14, 34]. Here, the induction of *AsPN* was confirmed both *in silico* and in RT-qPCR (Fig 6), at 6 and 9 DAI, the time points corresponding to the induction and aftermath of the HR in *A. stenosperma*, which reinforces its role in this defense response.

Another protein involved in mounting resistance responses via the accumulation of JA is allene oxidase cyclase (*AsAOC3*), which has been demonstrated to be a functional enzyme involved in the biosynthesis of JA and related compounds [56]. In this study, *AsAOC3* showed a good correlation between the *in silico* and qRT-PCR expression profiles (Fig 6). However, its role in this plant-nematode interaction is not yet clear, because regardless showing a trend of increased expression along the whole assay, this candidate gene was downregulated at all time points analysed (Fig 6).

Genes related to hormonal balance, cellular plasticity and signaling. Auxin signaling, which is generally recognized to be involved in plant growth and development, is also involved in the complicated network of plant–nematode interactions, with evidences that RKN interfere in auxin biosynthesis in feeding cells, thus, altering local hormone balance in order to form the giant cell complex [57]. Here, an Auxin Responsive Protein (*AsAUX/IAA*) was downregulated in response to *M. incognita* infection, in both qRT-PCR and *in silico* analysis, especially at 6 DAI (Fig 6). Moreover, previous analyses by macroarray and Northern blotting, showed that *AsARP*, a gene repressed by the presence of auxin, was strongly upregulated in *A. stenosperma* roots infected with *M. arenaria* [30]. These findings, the downregulation of an auxin-induced gene, *AsAUX/IAA*, and the upregulation of an auxin-repressed gene, *AsARP*, corroborate our previous hypothesis that the lack of auxin accumulation could lead to a failure in giant cell formation in incompatible host-RKN interactions, being part of the suite of defense genes regulated by hormones harbored by *A. stenosperma*.

Another constituent of the complex network of auxin signaling that regulates stress adaptation responses in plants is GH3), which encodes an IAA-amido synthetase that maintains auxin homeostasis by conjugating excess IAA (indole-3-acetic acid) to amino acids [58]. GH3 also inhibits expansin production, which on its turn is induced by IAA [59]. Expansins are cell wall-associated proteins that contribute for the cell wall plasticity and may also contribute to the plant vulnerability to pathogens. Therefore, the suppression of expansin might contribute to plant resistance to some pathogens. Considering that GH3 is induced by multiple pathogens, its mediated role in nematode resistance might be due, at least partly, to inhibiting the expression of expansins by suppressing auxin signaling [59].

In our study, *AsGH3.1*, which is an enzyme that prevents the free accumulation of auxin, showed a steady increase on its expression immediately after nematode perception (3 to 6 DAI) (Fig 6). At the same interaction period, an expansin homolog (*AsEXLB*) displayed a notable decrease on its expression, specially at 6 DAI, when HR is initially observed in the *A.stenosperma/M.arenaria* interaction [10] (Fig 6). This antagonist gene expression between *GH3.1* and expansin homologs has previously been described in rice infected with *Xanthomonas oryzae*, and proved to be a mechanism which contributed to an increased resistance to the pathogen [58]. In this study, we suggest that *AsGH3.1* and *AsEXLB* may also be interligated and contribute to the host defense response. Therefore, we hypothesize that *M. arenaria* initially (3 DAI) induces auxin production by the plant, in order to weaken the cell wall as an attempt to establish the giant cell [35]. However, the resistant *A. stenosperma* in turn, defends itself from auxin-facilitated nematode infection by preventing the loosening of its cell wall via suppressing auxin accumulation, as indicated by *AsAUX/IAA* and *AsARP* expression behavior discussed above. This is through the activation of *AsGH3.1* by the pathogen that, in its turn, inactivates IAA, by conjugating it to amino acids, preventing cell wall-loosening and nematode penetration, and therefore the establishment of the giant cell by the nematode.

To further support the role of membrane structural proteins in *A. stenosperma/M.arenaria* interaction, two other membrane-associated genes, coding for Tetraspanin (*AsTET*) and Integrin (*AsINT*) also displayed a compatible profile of increased expression in both, *in silico* and qRT-PCR (Fig 6). Tetraspanin is a membrane spanning protein containing a large extracellular loop, which provides interactive binding sites and reportedly has a role in development, pathogenesis and immune response in animal and plants [60]. The main suggested function for Tetraspanin is cell-to-cell signaling, which is also one of the main roles attributed to Integrins, that play a critical part in cell structure, migration and anchoring cells to the extracellular matrices [61]. A well known Integrin-like protein is the non-race specific disease resistance NDR1 gene in plants, a plasma membrane-localized protein that plays an essential role in resistance mediated by the NBS-LRR proteins, as it is a key signaling component of these responses during pathogen infection [62]. In our study, both *AsTET* and *AsINT* showed a steady increase in their expression along plant-nematode interaction, with upregulation after 6 DAI (Fig 6). This contributes to the assumption of their role in *A. stenosperma* in cell signaling and triggering the plant defense response against nematode parasitism.

Besides structural proteins, cell wall enzymes are thought to be important components of the mechanisms by which plants sense pathogens, including endo- β -mannanases [63], which overexpression has shown to increase resistance to root fungus in transgenic tobacco [64]. Here, *AsMAN* was upregulated during the whole period of the nematode-plant interaction analysed (Fig 6). Although it is well known that carbohydrate moieties on nematode surface are specific elicitors, functioning in the determinative stages of nematode-plant interactions [65], no indicative of mannan eliciting resistance by RKN has yet being described.

Transcription factors and DNA binding elements. The responses to pathogen invasion require large-scale transcriptional reprogramming, including those in some TF families. In this

study, two defense related TFs, *AsMYB25* and *AsWRKY49*, were shown to be upregulated in response to infection in both *in silico* and RT-qPCR analyses (Fig 6). These candidates are members of MYB and WRKY TF families identified as some of the most abundant in this study (Fig 2), suggesting their putative role in this incompatible plant-nematode interaction. Here, *AsWRKY49* increased its expression along the assay (Fig 6) and might be involved in the host response either by directly increasing the expression of PRs, or through the mediation of the NPR1 protein [66]. Likewise, MYB genes have been identified in other plant species displaying resistance to endosedentary nematodes [67], which contributes to the assumption that some representatives of this TF family in *A. stenosperma* may be involved in the response to *M. arenaria* parasitism.

Additionally, DC1 domain-containing zinc finger proteins have been demonstrated to play an important role in regulating the defense responses to biotic stresses, as they function as positive regulators of plant cell death programme (PCD) and SA-dependent defense responses [68]. In this study, an *A. stenosperma* DC1 homolog, *AsDC1* is induced at 6 and 9 DAI in response to the nematode infection both *in silico* and in qRT-PCR. Comparably, similar expression trend was observed for another protein containing a *AsU-box*, that through ubiquitin ligase activity, may act as regulators in defense against pathogen and PCD in plants [69].

Expression profiling of candidate genes in resistant and susceptible *Arachis* genotypes. In order to verify whether the 17 candidate genes selected above (DEGs) (Fig 6) are involved in global responses to RKN infestation in any *Arachis* species or in specific responses by RKN-resistant *A. stenosperma*, their expression profiles were analysed in two contrasting *Arachis* genotypes for *M. arenaria* resistance: *A. stenosperma* (resistant) and *A. hypogaea* cv Runner (susceptible). For that, qRT-PCR analysis was conducted with samples from a new bio-assay including control and inoculated roots of the two contrasting *Arachis* genotypes, using primers designed for *A. stenosperma* (S2 Table).

For 10 DEGs analyzed, single peaked melting curves were generated, indicating a specific amplicon in both *A. hypogaea* and *A. stenosperma*. Contrasting expression behaviors (up or downregulation) between the two genotypes were observed for eight genes (*AsOAC*, *AsAUX/IAA*, *AsCHI2*, *AsMAN*, *AsMYB25*, *AsTIR-NBS-LRR*, *AsWRKY49* and *AsLIP*) (Fig 7). The two remaining DEGs (*AsDC1* and *AsEXLB*), whereas showing a similar response to RKN infection

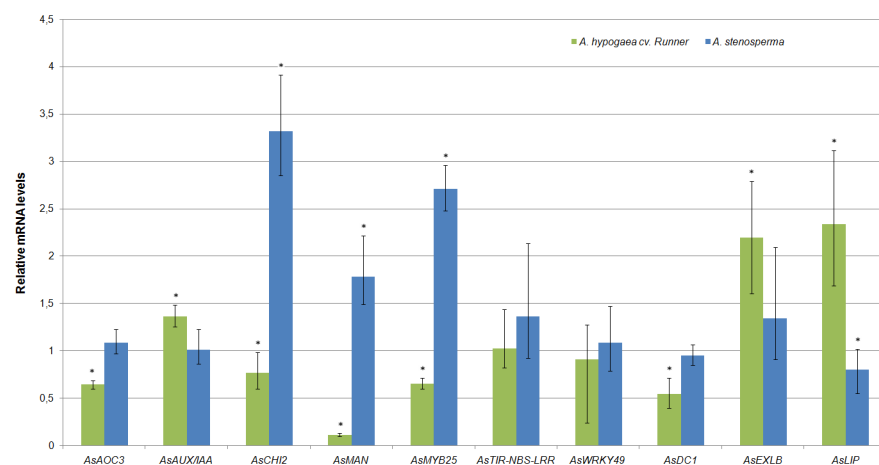


Fig 7. *A. stenosperma* and *A. hypogaea* qRT-PCR expression profile. Relative mRNA levels of 10 candidate genes in *A. stenosperma* and *A. hypogaea* roots inoculated with *M. arenaria* relative to control. Bars represent the standard deviation of two biological replicates. Significantly ($P < 0.05$) up- or downregulated genes are indicated by*.

doi:10.1371/journal.pone.0140937.g007

(downregulation for *AsDC1* and upregulation for *AsEXLB*), differed considerably in their fold change magnitude in each genotype (Fig 7).

The discrepancy in expression behavior of DEGs representing PRs, ETI receptors, and jasmonic acid (JA)- and salicylic acid (SA)-related proteins in RKN-resistant and susceptible genotypes following *M. arenaria* inoculation, coupled with their putative role in HR response discussed throughout this study, reinforce their involvement in the specific responses by RKN-resistant *A. stenosperma*, as in contrast to transcripts involved in global responses to RKN infestation in other genotypes.

Current knowledge of signaling mechanisms that operate during plant infestation by parasitic nematodes are limited, especially in wild species. In the present work, a deep transcriptome analysis allowed the identification of differentially expressed genes during the early stages (3 to 9 DAI) of the incompatible *A. stenosperma*/*M. arenaria* interaction. These genes, either involved in the PAMP-triggered immunity (PTI) or Effector-Triggered Immunity (ETI), were further validated by qRT-PCR, corroborating their potential as genes of interest. We found that both JA-dependent (patatin, allene oxidase cyclase) and SA-dependent (R genes, lipocalin, resveratrol synthase, chitinase) defense genes and their regulators (MYB, WRKY) were triggered in *A. stenosperma* roots when infected with *M. arenaria*. Additionally, proteins that are involved in the regulation of defense responses (DC1, U-BOX), cell signaling (mannanases, tetraspanin, integrin), cell plasticity (expansin) and hormonal balance (auxin responsive, GH3) were also differentially expressed in infected roots, with a number of them showing divergent expression profile in contrasting genotypes for *M. arenaria* resistance, reinforcing their role in specific responses by RKN-resistant *A. stenosperma*. Most of these genes constitute interesting candidates for further functional analysis, and their knock-down or gain-of-function effect in *A. rhizogenes*-induced hairy roots in composite peanut plants [70], will contribute to decipher their potential role in *A. stenosperma* defense mechanisms, including HR and SAR against *M. arenaria*.

The fact that genes participating in both defense hormone pathways (SA and JA) were identified in this plant-nematode interaction probably indicates the absence of a conflict between these signaling systems, as observed in the *Mi* mediated resistance in tomato [71] and other plant species [72, 73], where cross-talk between different hormone pathways has been shown to optimize the defense response against antagonists. These findings encourage the use of different signaling pathways mediating defense in peanut plants to optimize their defensive responses with both genetic (HR) and induced resistance (IR), which can be used in single or cumulative properties, and contribute to the reduction of its susceptibility to nematodes and possibly, also to other pests. Pyramiding or alternating resistance genes against *Meloidogyne* spp. has already proved to be effective in other crops [45], and once used to produce improved peanut cultivars, may also contribute to a more durable resistance and improve the long-term control of root-knot nematodes in the species.

Conclusions

Parasitic RKN evolved sophisticated strategies to infect plant causing worldwide yield losses. Sources of host resistance against the most damaging nematode species in peanut (*M. arenaria*) have been identified in its wild relative *A. stenosperma* and is due to the onset of the Hypersensitive Response. The present study suggests putative genes that trigger changes in specific signaling pathways either involved in the PAMP-triggered immunity (PTI) or Effector-Triggered Immunity (ETI), and also in structural arrangements involved in *A. stenosperma* resistance to RKN. The deployment of individual or combined resistance genes by marker assisted selection or via transgenic expression can offer several benefits for nematode control in an integrated

management strategy, reducing risks to the environment and to human health, accessibility for food, and the possibility of achieving durable, broad-spectrum nematode resistance.

Supporting Information

S1 Table. *A. stenosperma* contigs and their best protein homology at NCBI (BLASTX).
(XLSX)

S2 Table. Primer sequences of the differentially expressed genes (DEGs).
(DOCX)

S3 Table. Additional differentially expressed candidate genes in *A. stenosperma* roots infected with *M. arenaria*.
(DOCX)

S1 Fig. *A. stenosperma* ILLUMINA HI-Seq 2000 statistics.
(TIF)

Acknowledgments

José Francisco Montenegro Valls for providing the germplasm; Ana Zotta Mota for the bioinformatic support; Phillip A. Roberts for the nematode bioassays at Riverside University; Leandro Mesquita for green house assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PMG ACMB. Performed the experiments: PMG ACMB ACGA LAG ACQM MS CVM SCMLB TNO. Analyzed the data: OBS RCT DJB PMG ACMB LAG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PMG ACMB DJB SCMLB. Wrote the paper: PMG ACMB ACGA.

References

1. Guo B, Chen C, Chu Y, Holbrook C, Ozias-Akins P, Stalker HT. Advances in genetics and genomics for sustainable peanut production. *Sustainable Agriculture and New Biotechnologies*. 2011;341–67.
2. Pandey MK, Monyo E, Ozias-Akins P, Liang X, Guimaraes P, Nigam SN, et al. Advances in *Arachis* genomics for peanut improvement. *Biotechnology Advances*. 2012; 30(3):639–51. doi: [10.1016/j.biotechadv.2011.11.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.001) PMID: [22094114](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22094114/)
3. Leal-Bertioli S, Jose A, Alves-Freitas D, Moretzsohn M, Guimaraes P, Nielsen S, et al. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *BMC Plant Biology*. 2009; 9:112. doi: [10.1186/1471-2229-9-112](https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-112) PMID: [19698131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19698131/)
4. Burow M, Starr J, Park C-H, Simpson C, Paterson A. Introgression of homeologous quantitative trait loci (QTLs) for resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) in an advanced backcross-QTL population of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Breeding*. 2014; 34(2):393–406.
5. Danchin EGJ, Arguel M-J, Campan-Fournier A, Perfus-Barbeoch L, Magliano M, Rosso M-N, et al. Identification of Novel Target Genes for Safer and More Specific Control of Root-Knot Nematodes from a Pan-Genome Mining. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10):e1003745. doi: [10.1371/journal.ppat.1003745](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003745) PMID: [24204279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24204279/)
6. Tillman B, Stalker HT. Peanut. In: Vollmann J, Rajcan I, editors. *Oil Crops*: Springer New York; 2010. p. 287–315.
7. Holbrook C, Stalker H. Peanut breeding and genetic resources. *Plant Breeding Reviews*. 2003; 22:297–355.
8. Nagy E, Chu Y, Guo Y, Khanal S, Tang S, Li Y, et al. Recombination is suppressed in an alien introgression in peanut harboring *Rma*, a dominant root-knot nematode resistance gene. *Molecular Breeding*. 2010; 26(2):357–70.

9. Bendezu IF, Starr JL. Mechanism of Resistance to *Meloidogyne arenaria* in the Peanut Cultivar COAN. *Journal of Nematology*. 2003; 35(1):115–8. PMID: [19265984](#)
10. Proite K, Carneiro R, Falcão R, Gomes A, Leal-Bertioli S, Guimarães P, et al. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*. 2008; 57(5):974–80.
11. Abad P, Williamson VM. Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. In: Jean-Claude K, Michel D, editors. *Advances in Botanical Research*: Academic Press; 2010. p. 147–92.
12. Proite K, Leal-Bertioli S, Bertioli D, Moretzsohn M, Silva F, Martins N, et al. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biol*. 2007; 7:7. PMID: [17302987](#)
13. Guimarães P, Brasileiro A, Proite K, de Araújo A, Leal-Bertioli S, Pic-Taylor A, et al. A Study of Gene Expression in the Nematode Resistant Wild Peanut Relative, *Arachis stenosperma*, in Response to Challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Tropical Plant Biol*. 2010; 3(4):183–92.
14. Morgante CV, Brasileiro ACM, Roberts PA, Guimaraes LA, Araujo ACG, Fonseca LN, et al. A survey of genes involved in *Arachis stenosperma* resistance to *Meloidogyne arenaria* race 1. *Functional Plant Biology*. 2013; 40(12):1298–309.
15. Zhang J, Liang S, Duan J, Wang J, Chen S, Cheng Z, et al. *De novo* assembly and Characterisation of the Transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Genomics*. 2012; 13(1):90.
16. Chen X, Zhu W, Azam S, Li H, Zhu F, Li H, et al. Deep sequencing analysis of the transcriptomes of peanut aerial and subterranean young pods identifies candidate genes related to early embryo abortion. *Plant Biotechnology Journal*. 2013; 11(1):115–27. doi: [10.1111/pbi.12018](#) PMID: [23130888](#)
17. Yin D, Wang Y, Zhang X, Li H, Lu X, Zhang J, et al. *De Novo* Assembly of the Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seed Transcriptome Revealed Candidate Unigenes for Oil Accumulation Pathways. *PLoS ONE*. 2013; 8(9):e73767. doi: [10.1371/journal.pone.0073767](#) PMID: [24040062](#)
18. Morgante C, Guimaraes P, Martins A, Araujo A, Leal-Bertioli S, Bertioli D, et al. Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. *BMC Research Notes*. 2011; 4(1):339.
19. Zhao S, Fernald RD. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*. 2005; 12(8):1047–64.
20. Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 2004; 26(6):509–15. PMID: [15127793](#)
21. Kim KH, Kang YJ, Kim DH, Yoon MY, Moon J-K, Kim MY, et al. RNA-Seq Analysis of a Soybean Near-Isogenic Line Carrying Bacterial Leaf Pustule-Resistant and -Susceptible Alleles. *DNA Research*. 2011; 18(6):483–97. doi: [10.1093/dnares/dsr033](#) PMID: [21987089](#)
22. Hiremath PJ, Farmer A, Cannon SB, Woodward J, Kudapa H, Tuteja R, et al. Large-scale transcriptome analysis in chickpea (*Cicer arietinum* L.), an orphan legume crop of the semi-arid tropics of Asia and Africa. *Plant Biotechnology Journal*. 2011; 9(8):922–31. doi: [10.1111/j.1467-7652.2011.00625.x](#) PMID: [21615673](#)
23. Varshney RK, Chen W, Li Y, Bharti AK, Saxena RK, Schlueter JA, et al. Draft genome sequence of pigeonpea (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers. *Nat Biotech*. 2012; 30(1):83–9.
24. Kalavacharla V, Liu Z, Meyers B, Thimmapuram J, Melmaiee K. Identification and analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) transcriptomes by massively parallel pyrosequencing. *BMC Plant Biology*. 2011; 11(1):135.
25. Proite K, Leal-Bertioli S, Bertioli D, Moretzsohn M, da Silva F, Martins N, et al. ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology*. 2007; 7(1):7.
26. Guimaraes P, Brasileiro A, Morgante C, Martins A, Pappas G, Silva O, et al. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC Genomics*. 2012; 13(1):387.
27. Wu N, Matand K, Wu H, Li B, Li Y, Zhang X, et al. *De novo* next-generation sequencing, assembling and annotation of *Arachis hypogaea* L. Spanish botanical type whole plant transcriptome. *Theoretical and Applied Genetics*. 2013; 126(5):1145–9. doi: [10.1007/s00122-013-2042-8](#) PMID: [23338522](#)
28. Brasileiro AM, Morgante C, Araujo AG, Leal-Bertioli SM, Silva A, Martins AQ, et al. Transcriptome Profiling of Wild *Arachis* from Water-Limited Environments Uncovers Drought Tolerance Candidate Genes. *Plant Mol Biol Rep*. 2015:1–17.
29. Schaff JE, Nielsen DM, Smith CP, Scholl EH, Bird DM. Comprehensive Transcriptome Profiling in Tomato Reveals a Role for Glycosyltransferase in Mi-Mediated Nematode Resistance. *Plant Physiology*. 2007; 144(2):1079–92. PMID: [17434994](#)

30. Guimarães P, Brasileiro A, Proite K, de Araújo A, Leal-Bertioli S, Pic-Taylor A, et al. A Study of Gene Expression in the Nematode Resistant Wild Peanut Relative, *Arachis stenosperma*, in Response to Challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Tropical Plant Biol.* 2010;1–10.
31. Chen N, Yang Q, Pan L, Chi X, Chen M, Hu D, et al. Identification of 30 MYB transcription factor genes and analysis of their expression during abiotic stress in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Gene.* 2014; 533(1):332–45. doi: [10.1016/j.gene.2013.08.092](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.092) PMID: [24013078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24013078/)
32. Hong L, Hu B, Liu X, He CY, Yao Y, Li XL, et al. Molecular cloning and expression analysis of a new stress-related AREB gene from *Arachis hypogaea*. *Biol Plant.* 2013; 57(1):56–62.
33. Udvardi MK, Kakar K, Wandrey M, Montanari O, Murray J, Andriankaja A, et al. Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment. *Plant Physiology.* 2007; 144(2):538–49. PMID: [17556517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17556517/)
34. Tirumalaraju SV, Jain M, Gallo M. Differential gene expression in roots of nematode-resistant and -susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization. *Journal of Plant Physiology.* 2011; 168(5):481–92. doi: [10.1016/j.jplph.2010.08.006](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.08.006) PMID: [20863592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20863592/)
35. Portillo M, Cabrera J, Lindsey K, Topping J, Andrés MF, Emiliozzi M, et al. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with Arabidopsis: a functional role for gene repression. *New Phytologist.* 2013; 197(4):1276–90. doi: [10.1111/nph.12121](https://doi.org/10.1111/nph.12121) PMID: [23373862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23373862/)
36. Das S, Ehlers J, Close T, Roberts P. Transcriptional profiling of root-knot nematode induced feeding sites in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using a soybean genome array. *BMC Genomics.* 2010; 11(1):480.
37. Jammes F, Lecomte P, de Almeida-Engler J, Bitton F, Martin-Magniette M-L, Renou JP, et al. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *The Plant Journal.* 2005; 44(3):447–58. PMID: [16236154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16236154/)
38. Klink V, Overall C, Alkharouf N, MacDonald M, Matthews B. A time-course comparative microarray analysis of an incompatible and compatible response by *Glycine max* (soybean) to *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode) infection. *Planta.* 2007; 226(6):1423–47. PMID: [17653570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17653570/)
39. Fuller VL, Lilley CJ, Urwin PE. Nematode resistance. *New Phytologist.* 2008; 180(1):27–44. doi: [10.1111/j.1469-8137.2008.02508.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02508.x) PMID: [18564304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18564304/)
40. Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, et al. mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal.* 2004; 37(6):914–39. PMID: [14996223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14996223/)
41. Nandi B, Kundu K, Banerjee N, Babu SPS. Salicylic acid-induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. *Nematology.* 2003; 5(5):747–52.
42. Branch C, Hwang C-F, Navarre DA, Williamson VM. Salicylic Acid Is Part of the *Mi-1*-Mediated Defense Response to Root-Knot Nematode in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 2004; 17(4):351–6. PMID: [15077667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15077667/)
43. Melillo MT, Leonetti P, Bongiovanni M, Castagnone-Sereno P, Bleve-Zacheo T. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. *New Phytologist.* 2006; 170(3):501–12. PMID: [16626472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16626472/)
44. Williamson VM, Kumar A. Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics.* 2006; 22(7):396–403. PMID: [16723170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16723170/)
45. Djian-Caporalino C, Palloix A, Fazari A, Marteu N, Barbary A, Abad P, et al. Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biology.* 2014; 14(1):53.
46. van der Hoorn RAL, Kamoun S. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell.* 2008; 20(8):2009–17. doi: [10.1105/tpc.108.060194](https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194) PMID: [18723576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18723576/)
47. Zinovieva SV, Vasyukova NI, Udalova ZV, Gerasimova NG, Ozeretskovskaya OL. Involvement of salicylic acid in induction of nematode resistance in plants. *Biol Bull Russ Acad Sci.* 2011; 38(5):453–8.
48. Charron J-B, Ouellet F, Houde M, Sarhan F. The plant Apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biology.* 2008; 8(1):86.
49. Kiselev KV, Dubrovina AS, Isaeva GA, Zhuravlev YN. The effect of salicylic acid on phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *Vitis amurensis* Cell Culture. *Russ J Plant Physiol.* 2010; 57(3):415–21.
50. Chang X, Heene E, Qiao F, Nick P. The Phytoalexin Resveratrol Regulates the Initiation of Hypersensitive Cell Death in *Vitis* Cell. *PLoS ONE.* 2011; 6(10):e26405. doi: [10.1371/journal.pone.0026405](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026405) PMID: [22053190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22053190/)

51. Lopes R, Silveira D, Gimenes M, Vasconcelos P, Alves Rd, Silva J, et al. Characterization of resveratrol content in ten wild species of section *Arachis*, genus *Arachis*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013; 60(8):2219–26.
52. Gan Z, Yang J, Tao N, Liang L, Mi Q, Li J, et al. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase *Lpch1* and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 76(6):1309–17. PMID: [17665191](#)
53. Isayenkov S, Mrosk C, Stenzel I, Strack D, Hause B. Suppression of Allene Oxide Cyclase in Hairy Roots of *Medicago truncatula* Reduces Jasmonate Levels and the Degree of Mycorrhization with *Gliomus intraradices*. *Plant Physiology*. 2005; 139(3):1401–10. PMID: [16244141](#)
54. Soriano I, Riley I, Potter M, Bowers W. Phytoecdysteroids: A Novel Defense Against Plant-Parasitic Nematodes. *J Chem Ecol*. 2004; 30(10):1885–99. PMID: [15609826](#)
55. Camera SL, Balagué C, Göbel C, Geoffroy P, Legrand M, Feussner I, et al. The Arabidopsis Patatin-Like Protein 2 (PLP2) Plays an Essential Role in Cell Death Execution and Differentially Affects Biosynthesis of Oxylipins and Resistance to Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2009; 22(4):469–81. doi: [10.1094/MPMI-22-4-0469](#) PMID: [19271961](#)
56. Riemann M, Haga K, Shimizu T, Okada K, Ando S, Mochizuki S, et al. Identification of rice Allene Oxide Cyclase mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Journal*. 2013; 74(2):226–38. doi: [10.1111/tpj.12115](#) PMID: [23347338](#)
57. Doyle EA, Lambert KN. *Meloidogyne javanica* Chorismate Mutase 1 Alters Plant Cell Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2003; 16(2):123–31. PMID: [12575746](#)
58. Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X, et al. Activation of the Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *The Plant Cell Online*. 2008; 20(1):228–40.
59. Fu J, Liu H, Li Y, Yu H, Li X, Xiao J, et al. Manipulating Broad-Spectrum Disease Resistance by Suppressing Pathogen-Induced Auxin Accumulation in Rice. *Plant Physiology*. 2011; 155(1):589–602. doi: [10.1104/pp.110.163774](#) PMID: [21071600](#)
60. Wang F, Vandepoele K, Van Lijsebettens M. Tetraspanin genes in plants. *Plant Science*. 2012; 190(0):9–15.
61. Zhu W, Wei W, Fu Y, Cheng J, Xie J, Li G, et al. A Secretory Protein of Necrotrophic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum* That Suppresses Host Resistance. *PLoS ONE*. 2013; 8(1):e53901. doi: [10.1371/journal.pone.0053901](#) PMID: [23342034](#)
62. Knepper C, Savory EA, Day B. Arabidopsis NDR1 Is an Integrin-Like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion. *Plant Physiology*. 2011; 156(1):286–300. doi: [10.1104/pp.110.169656](#) PMID: [21398259](#)
63. Schröder R, Atkinson RG, Redgwell RJ. Re-interpreting the role of endo- β -mannanases as mannan endotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. *Annals of Botany*. 2009; 104(2):197–204. doi: [10.1093/aob/mcp120](#) PMID: [19454593](#)
64. Xu X, Zhang Y, Meng Q, Meng K, Zhang W, Zhou X, et al. Overexpression of a Fungal β -Mannanase from *Bispora* sp. *MEY-1* in Maize Seeds and Enzyme Characterization. *PLoS ONE*. 2013; 8(2):e56146. doi: [10.1371/journal.pone.0056146](#) PMID: [23409143](#)
65. Davies KG, Curtis RHC. Cuticle Surface Coat of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 2011; 49(1):135–56.
66. Singh KB, Foley RC, Oñate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002; 5(5):430–6. PMID: [12183182](#)
67. Uehara T, Sugiyama S, Matsuura H, Arie T, Masuta C. Resistant and Susceptible Responses in Tomato to Cyst Nematode are Differentially Regulated by Salicylic Acid. *Plant and Cell Physiology*. 2010; 51(9):1524–36. doi: [10.1093/pcp/pcq109](#) PMID: [20660227](#)
68. Hwang IS, Choi DS, Kim NH, Kim DS, Hwang BK. The pepper cysteine/histidine-rich DC1 domain protein CaDC1 binds both RNA and DNA and is required for plant cell death and defense response. *New Phytologist*. 2014; 201(2):518–30. doi: [10.1111/nph.12521](#) PMID: [24117868](#)
69. Zeng L-R, Qu S, Bordeos A, Yang C, Baraoidan M, Yan H, et al. Spotted leaf11, a Negative Regulator of Plant Cell Death and Defense, Encodes a *U-Box/Armadillo* Repeat Protein Endowed with *E3 Ubiquitin* Ligase Activity. *The Plant Cell*. 2004; 16(10):2795–808. PMID: [15377756](#)
70. Chu Y, Guimarães LA, Wu CL, Timper P, Holbrook CC, Ozias-Akins P. A Technique to Study *Meloidogyne arenaria* Resistance in *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Peanut. *Plant Disease*. 2014; 98(10):1292–9.
71. Zinovieva SV, Vasyukova NI, Udalova ZV, Gerasimova NG. The Participation of salicylic and jasmonic acids in genetic and induced resistance of tomato to *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919). *Biol Bull Russ Acad Sci*. 2013; 40(3):297–303.

72. Zambounis A, Kalamaki M, Tani E, Paplomatas E, Tsaftaris A. Expression Analysis of Defense-Related Genes in Cotton (*Gossypium hirsutum*) after *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Infection and Following Chemical Elicitation using a Salicylic Acid Analog and Methyl Jasmonate. *Plant Mol Biol Rep*. 2012; 30(1):225–34.
73. Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*. 17(5):260–70. doi: [10.1016/j.tplants.2012.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010) PMID: [22498450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22498450/)