



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 Biológicas, 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 (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos e taxa de bancada aos dois últimos anos de doutorado.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) 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 Vianna 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 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, Jessica Monteiro e Marcilene Fernandes), 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 queridos e amados amigos: Thata Nicolini, pela amizade inicialmente tímida, porém forte e agora “grudenta” (ahahah), obrigada por me ajudar nos infinitos experimentos propostos e realizados, nos expedientes intermináveis, na vida dentro e fora do lab e no companheirismo do dia-a-dia. Robs Ferreira, obrigada pelo seu coração grandioso, pelo carinho infinito, por ser a pessoa mais altruísta e companheira que já conheci na vida e por toda a sua força, a sua garra, seu amor e persistência pelas coisas, pelas pessoas e por mim. Líginha Almeida, obrigada por ser tão companheira, pelos conselhos de vida, por ser um baita exemplo de pessoa para mim, pelo carinho e amor, por toda ajuda que já me deu dentro e fora do lab e por lágrimas e gargalhadas que já arrancou de mim. Gabi Villeth, a mistura mais doce e ogra que a vida me apresentou, obrigada por sua amizade, por permanecer ao meu lado, pelas histórias mais doidas e por todo carinho. Zottinha, a criatura mais inquieta, pensante, animada, risonha e tagarela, obrigada por alegrar meus dias no lab e as vezes me enlouquecer com suas ideias mirabolantes. Eduardo Paiva, Lara Paiva e Perla Villalba, obrigada pelos vários momentos especiais que vivi ao lado de vocês e pela nossa duradoura amizade. Lulys Ferraço, Babi e Lari Gaspar, por todo carinho, conselho e apoio que me ofereceram todas as vezes que precisei.

Ao meu namorado, Ramiro Nicolodi Gomes, que chegou em minha vida no olho do furacão (as vésperas da qualificação) e ali permaneceu até hoje, aguentando os altos e baixos da vida de uma doutoranda. Obrigada por tudo, meu lindo! Pela paciência, amor e carinho, pelos kits anti-estresse e por todos os infinitos incentivos que me deu!

Aos meus pais amados, Rose e Erivaldo, agradeço pelo amor e ajuda incondicional que sempre me deram, acreditando em mim e nos meus sonhos, me proporcionando a chance de seguir essa vida acadêmica (nada fácil), apoiando e se orgulhando tanto das minhas conquistas!

A Silvana, as minhas irmãs (Anna Paula e Larissa) e a toda a minha família, que torceram, que se preocuparam, que me incentivaram e que vibraram comigo. Muito obrigada pela ajuda e pela compreensão nos momentos difíceis.

A Catarina, minha afilhada amada, obrigada por ter trazido leveza aos momentos de muito estresse com sua energia, sorrisos, marmotices, carinhos e chuvas de beijos aleatórias e espontâneas.

Ao tio Paulo Gaspar (*in memoriam*), obrigada por me ajudar a escolher a profissão que eu mais amo!

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	xi
Abstract	xii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xiv
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	76
CAPÍTULO 3 – Avaliação <i>in planta</i> dos genes-candidatos.....		77
1.	Introdução	78
2.	Material e Métodos.....	80
2.1.	Seleção de genes candidatos para avaliação da superexpressão <i>in planta</i> ..	80
2.2.	Construção do vetor de expressão.....	80
2.3.	Transformação de <i>Agrobacterium</i> spp. com os genes candidatos	81
2.4.	Transformação de folha destacada de <i>Arachis hypogaea</i> com <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	82
2.5.	Avaliação da infecção do nematoide em raízes transgênicas.....	82

2.6.	Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	82
2.7.	Avaliação das plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> sob estresse hídrico	83
2.8.	Avaliação da expressão gênica.....	83
3.	Resultados	84
3.1.	Seleção dos genes candidatos para avaliação <i>in planta</i>	84
3.2.	Transformações das linhagens de <i>Agrobacterium</i> spp	84
3.3.	Transformação de folhas destacadas de <i>Arachis</i> com os genes candidatos e avaliação de seu efeito na resistência ao nematoide das galhas	85
3.4.	Transformação de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> com os genes candidatos e análise na tolerância à seca.....	87
4.	Discussão	89
	Conclusões e Perspectivas.....	93
	Referências Bibliográficas	94
	Apêndices.....	119

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, duas proteínas relacionadas a patogênese (PRs), ambas responsivas à seca e uma delas responsiva também ao ataque do nematoide, foram selecionadas para avaliação quanto ao efeito de sua superexpressão em resposta a esses estresses. 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, two pathogenesis-related proteins (PRs), both responsive to drought and one of them also responsive to nematode attack, were selected for evaluation as to the effect of their overexpression in response to these stresses. 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).	120
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.	121
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	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países produtores de amendoim. Divisão (cores) quantidade de produção (em milhões de toneladas – Mt) por país.	17
Figura 2 - Distribuição geográfica de todas as espécies do gênero <i>Arachis</i> (delimitada pela linha pontilhada) e distribuição das espécies da seção <i>Arachis</i> (delimitada em amarelo).....	18
Figura 3 – Imagem ilustrativa do hábito reprodutivo geocárpico apresentado por todas as espécies do gênero <i>Arachis</i>	18
Figura 4 - Esquema ilustrativo do provável evento de cruzamento que resultou a espécie alotetraploide (AABB), <i>A. hypogaea</i>	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).	25
Figura 7 - Sintomas causados pela infecção por <i>M. arenaria</i> em plantas de amendoim.....	26
Figura 8 – Plantas de <i>A. duranensis</i> submetidas a uma diminuição gradual da água (<i>dry-down</i>).	39
Figura 9 - Mapas comparativos em 2D de raízes de <i>A. duranensis</i> sob condições controle e de estresse hídrico mostrando proteínas diferencialmente abundantes.	40
Figura 10 - Perfil da abundância de 30 proteínas identificadas pela técnica de 2-DE em raízes de plantas de <i>A. duranensis</i> submetidas ao déficit hídrico (EST) e na condição controle (CTR).	42
Figura 11 – Mapa de calor de da expressão diferencial do proteoma e transcrito (<i>in silico</i> e RT-qPCR) em raízes de <i>A. duranensis</i> controle e submetidas à seca.	50
Figura 12 - Mapas comparativos em 2D de raízes de plantas de <i>A. stenosperma</i> controle (0 DAI) e inoculadas (3, 6 e 9 DAI) com <i>M. arenaria</i> , 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 <i>A. stenosperma</i> inoculadas (3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (0 DAI) com <i>M. arenaria</i>	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.	67
Figura 15 - Redes de interações proteína-proteína identificadas a partir de raízes de <i>A. stenosperma</i> inoculadas e não inoculadas com <i>M. arenaria</i>	68
Figura 16 – Diagrama de Venn com a distribuição dos genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR $\leq 0,05$) em raízes de <i>A. stenosperma</i> inoculadas (3, 6 e 9 DAI) em relação as raízes não inoculadas (0 DAI) com <i>M. arenaria</i> . DAI – dias após a inoculação.....	69
Figura 17 – Sobreposição de proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS ^E e de genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR $\leq 0,05$) por RNA-Seq.	70
Figura 18 - Visão geral da expressão gênica e abundância proteica de 18 DAPs identificadas em raízes de <i>A. stenosperma</i> inoculadas (INOC - 3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (CTR - 0 DAI) com <i>M. arenaria</i>	72
Figura 19 - Mapas dos vetores.	81
Figura 20 - Gráfico de expressão relativa dos genes candidatos selecionados para superexpressão em plantas transgênicas.....	84
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.	85
Figura 22 - Imagens ilustrativas de raízes transgênicas induzidas por <i>A. rhizogenes</i> em folhas de amendoim e o efeito da superexpressão dos genes dos genes candidatos na quantidade de galhas por grama de raiz avaliada.....	85
Figura 23 - Infecção por <i>M. arenaria</i> raça 1 em raízes transgênicas (pPZP-eGFP) induzidas por <i>A. rhizogenes</i> a partir de folhas destacadas de <i>A. hypogaea</i> , por meio do processo de coloração dos nematoides com fucsina ácida e das massas de ovos com floxina B.	86

Figura 24 - Gráficos comparativos com o número médio de galhas por grama de raízes transgênicas obtidas a partir de folhas destacadas de amendoim.....	86
Figura 25 – Plantas de <i>A. thaliana</i> superexpressando um dos genes candidatos submetidas à diminuição gradual de água no solo (<i>dry-down</i>).	88
Figura 26 - Imagem ilustrativa da diferença observada entre o tamanho da parte aérea das plantas de <i>A. thaliana</i>	90
Figura Suplementar 1 – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de <i>A. duranensis</i> submetidas ao déficit hídrico.	119
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 <i>A. duranensis</i> submetidas ao déficit hídrico.	119
Figura Suplementar 3 – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de <i>A. stenosperma</i> não inoculada (0 DAI) e inoculadas com <i>M. arenaria</i> (3, 6 e 9 DAI).	123

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).

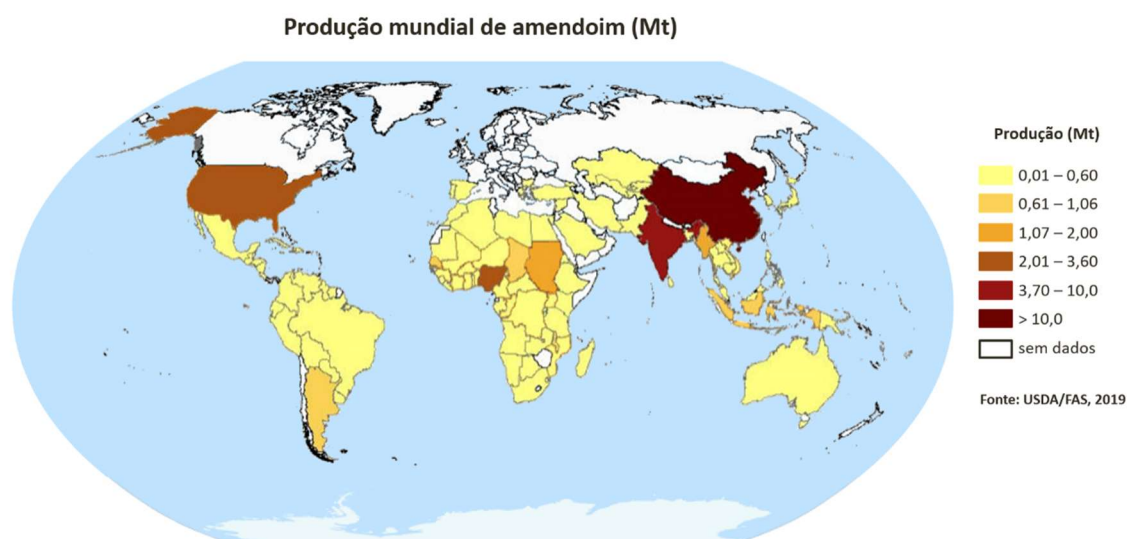


Figura 1 – Países produtores de amendoim. Divisão (cores) quantidade de produção (em milhões de toneladas – Mt) por país. Imagem adaptada aos dados de USDA/FAS, 2019b.

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.

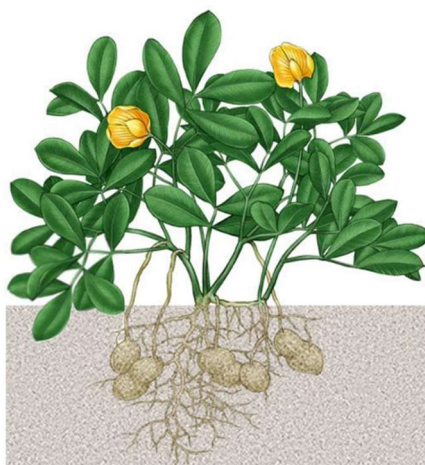


Figura 3 – Imagem ilustrativa do hábito reprodutivo geocárpico apresentado por todas as espécies do gênero *Arachis*. Fonte da imagem modificada: <https://www.fibrasynormasdecolumbia.com/terminos-definiciones/nitrogeno-tierra-ciclos-e-importancia/>.

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).

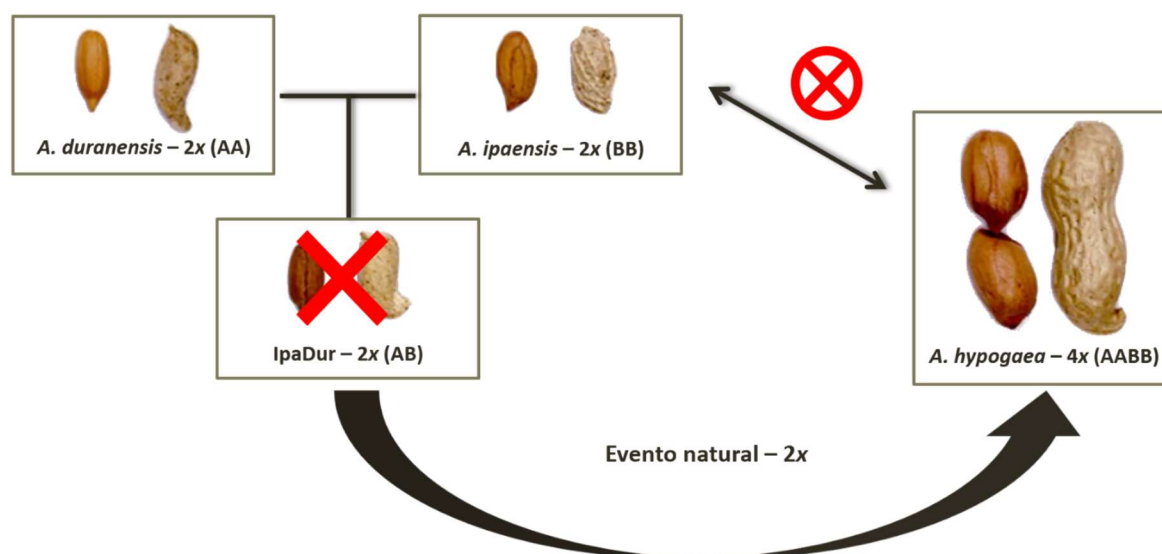


Figura 4 - Esquema ilustrativo do provável evento de cruzamento que resultou a espécie alotetraploide (AABB), *A. hypogaea*. Fonte das imagens das sementes: Leal-Bertoli et al., 2017.

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).

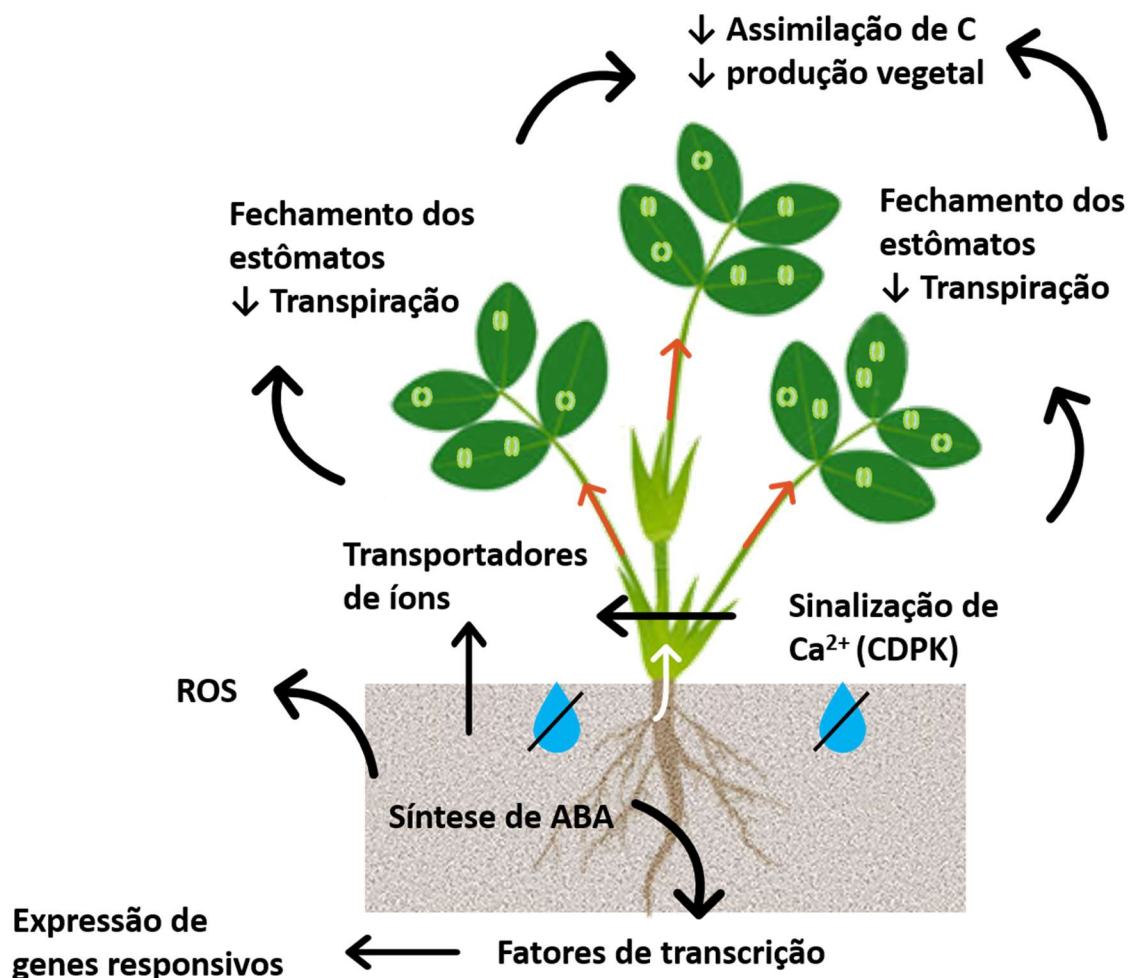


Figura 5 - Esquema simplificado e ilustrativo da resposta desencadeada pela planta ao déficit hídrico.

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 fitonematoides 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 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).

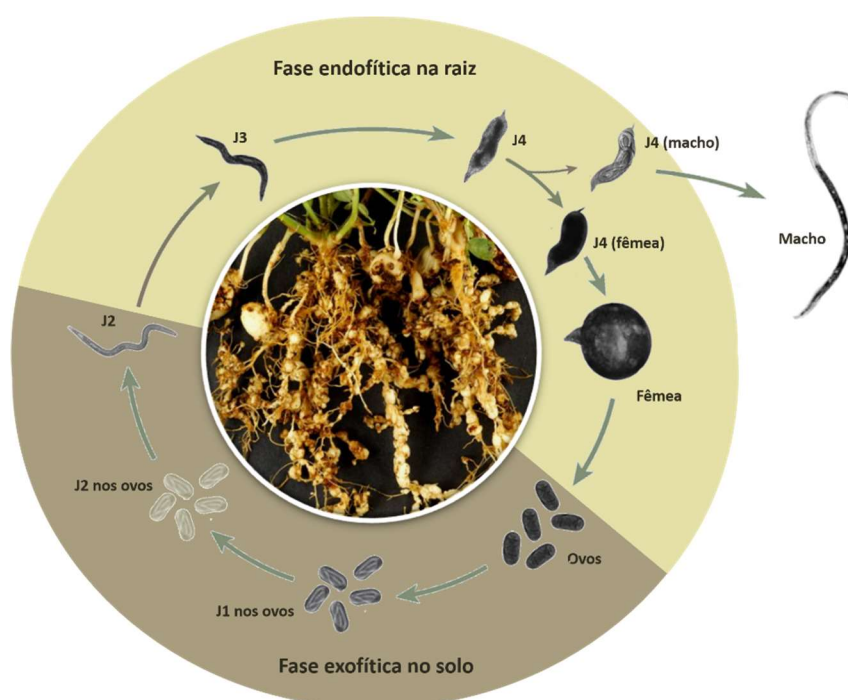


Figura 6 - Imagem ilustrativa do ciclo de vida do nematoide das galhas. Ao centro, sintomas típicos (galhas) de meloidoginose em raízes de amendoim (<http://site.extension.uga.edu>). Imagem adaptada a partir de Castagnone-Sereno et al., 2013.

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 nematoides 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 e Goto, 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 agrônomicas 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, 2015), 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 sistemicamente 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

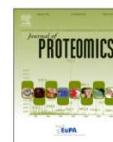
Journal of Proteomics 192 (2019) 299–310



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., 2017a; 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	CCATCTTTGGTTGCTTCGT	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).

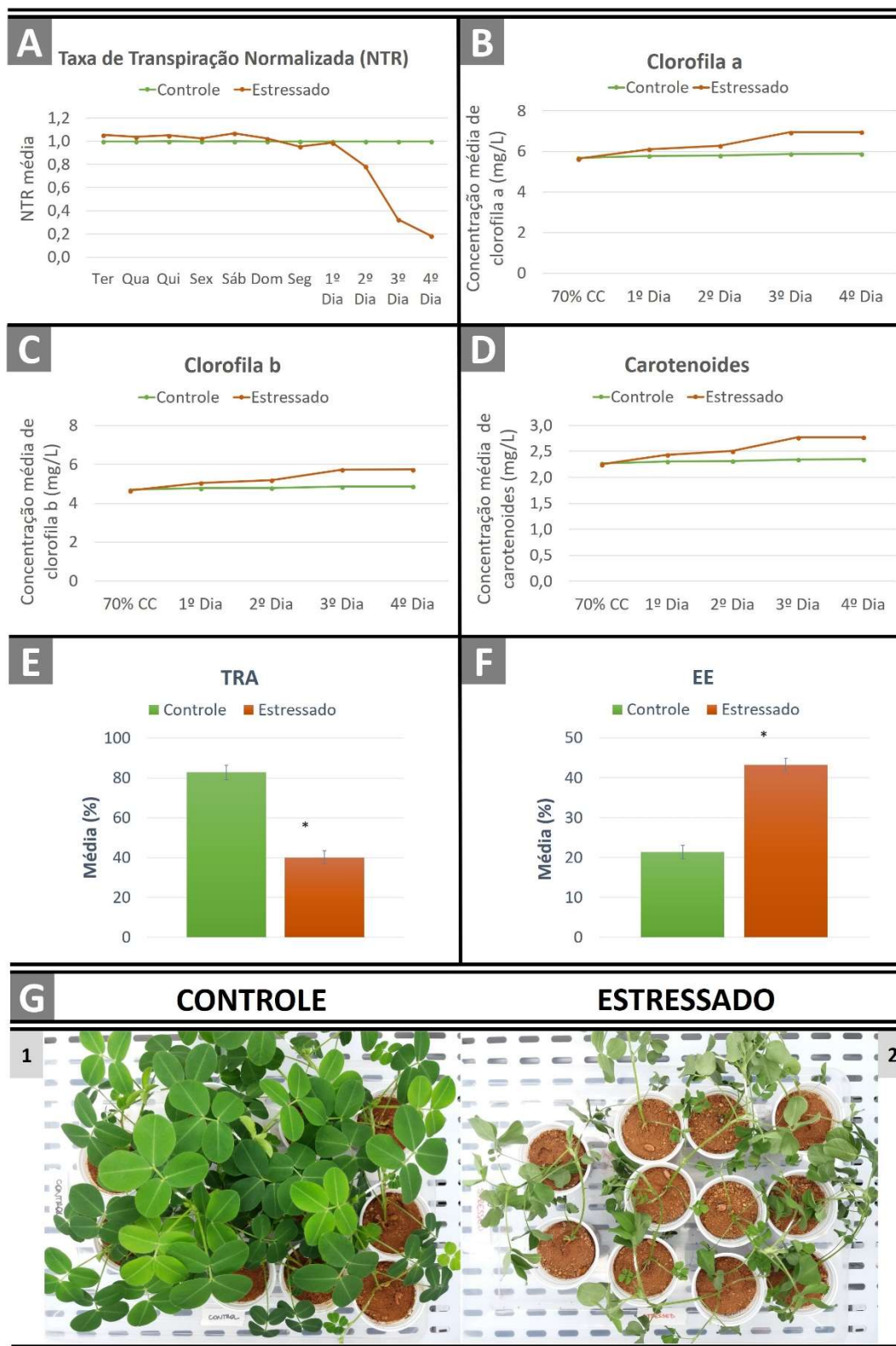


Figura 8 – Plantas de *A. duranensis* submetidas a uma diminuição gradual da água (*dry-down*). A) Taxa de transpiração normalizada (NTR) de plantas de *A. duranensis* durante o experimento de *dry-down*. **B-D)** Concentração média dos pigmentos fotossintéticos em plantas controle e estressadas (clorofila 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).

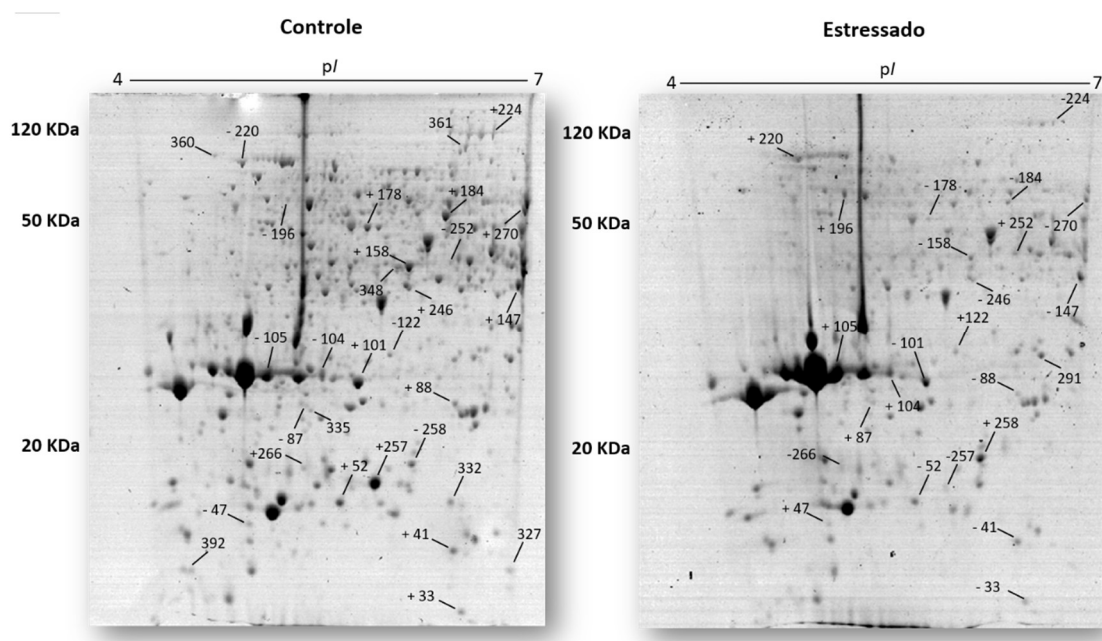
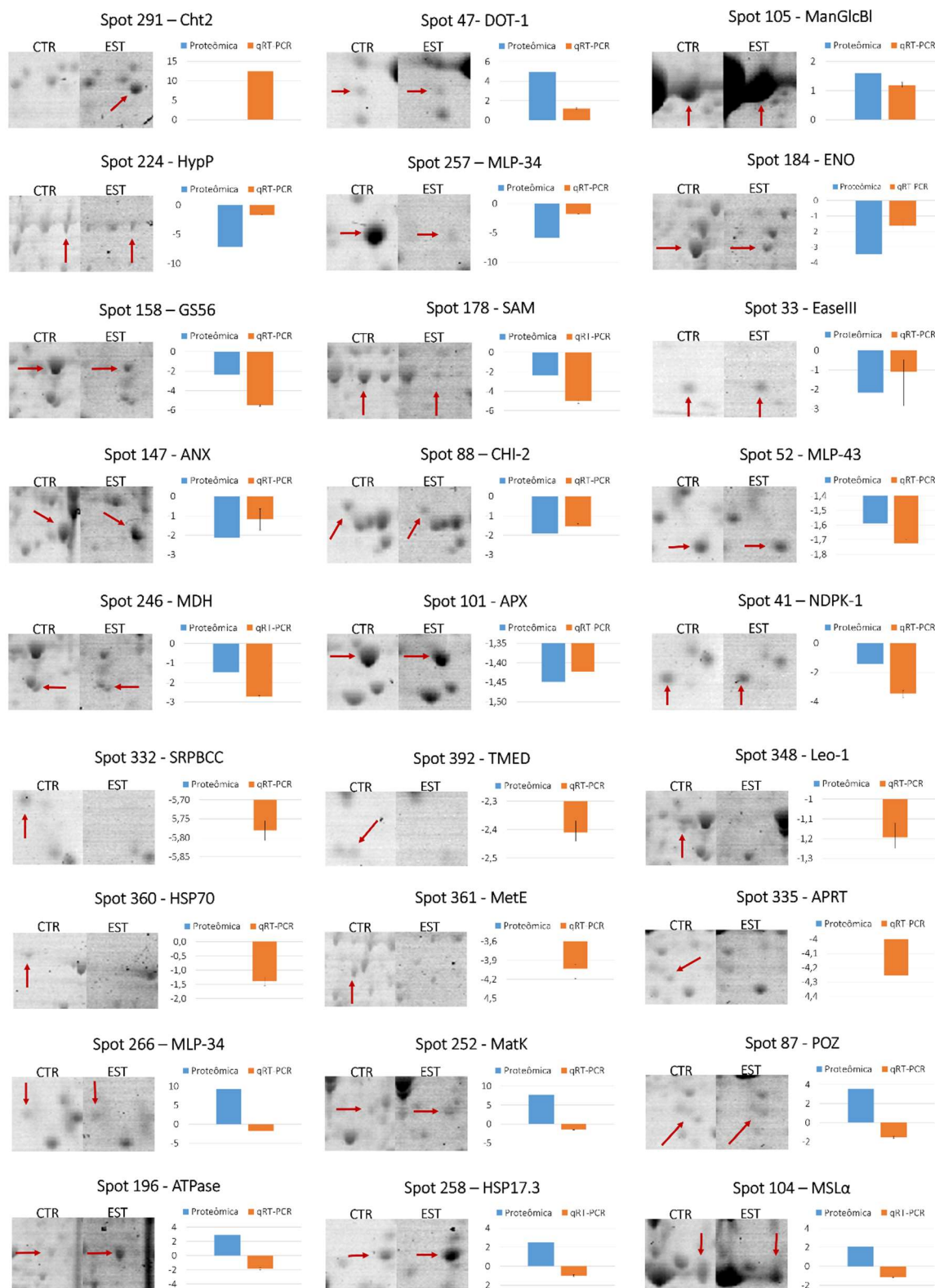


Figura 9 - Mapas comparativos em 2D de raízes de *A. duranensis* sob condições controle e de estresse hídrico mostrando proteínas diferencialmente abundantes. (+) abundância aumentada, (-) abundância diminuída e () proteína exclusivas em ambas as condições.

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)

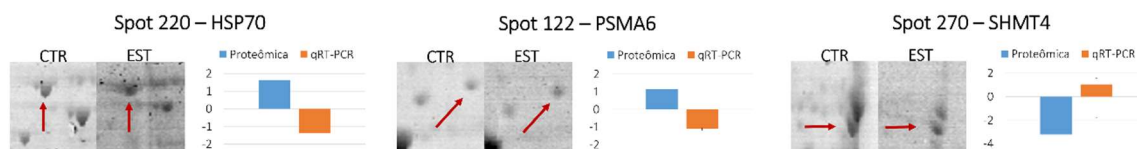


Figura 10 - Perfil da abundância de 30 proteínas identificadas pela técnica de 2-DE em raízes de plantas de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico (EST) e na condição controle (CTR). Os gráficos representam a variação da abundância diferencial de proteínas (barra azul – determinada pelo programa 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; Raeini 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., 2016a). 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
Metabolismo de aminoácido											
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.YGAGIGPGVYDIHSPR.I	<i>Solenostemon</i> <i>Scutellarioides</i>	CAA89019	87	89	6.17	6.49	52	2/1	Exclusivo do Controle
Metabolismo-C1											
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	55	6.65 6.84 6.84 6.84 6.84	6.92 61 78 53 51	187 2/1 3/1 2/1 3/1	41/22 2/1 3/1 2/1 3/1	-3.20
Organização celular											
147	Annexin Annexin Annexin Annexin Fiber annexin, partial Fiber annexin, partial (ANX)	- K.LLLPLVSSYR.Y K.ADPKDEFLLLR.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
Síntese de DNA											
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
Glicólise											
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
Manuseio de metal											
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
Transporte de elétron mitocondrial/Síntese de ATP											
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
Sem atribuição											
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	
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.AFKDTIDLFVER.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	
		-LDLSFSYNNFEQDDERNLILQGDAK.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 (MSLα)	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 6.65 6.65 6.65	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	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	43/7 5/1 8/1 113	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	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., 2017b). 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 (Jungkunz 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; Thangella 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 (Hussain 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).

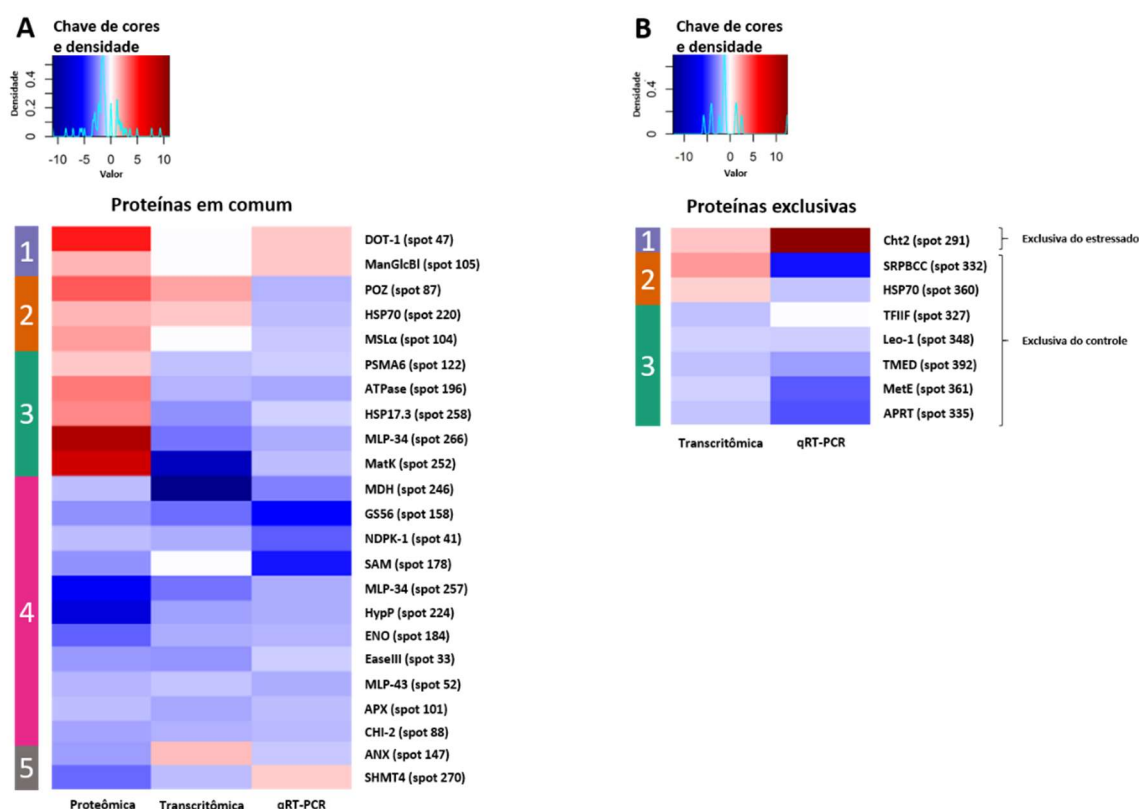


Figura 11 – Mapa de calor de da expressão diferencial do proteoma e transcriptoma (*in silico* e RT-qPCR) em raízes de *A. duranensis* controle e submetidas à seca. A) Análise de clusterização de proteínas com abundância diferencial e seus mRNAs correspondentes (*in silico* e RT-qPCR). B) Análise de 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 quinta cultura oleaginosa mais importante (USDA/FAS, 2019a) e 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; Xing e Chen, 2015; Akram et al., 2018).

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 oitavo e o 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 muitos 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 muitos 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 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 (Lohse 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).

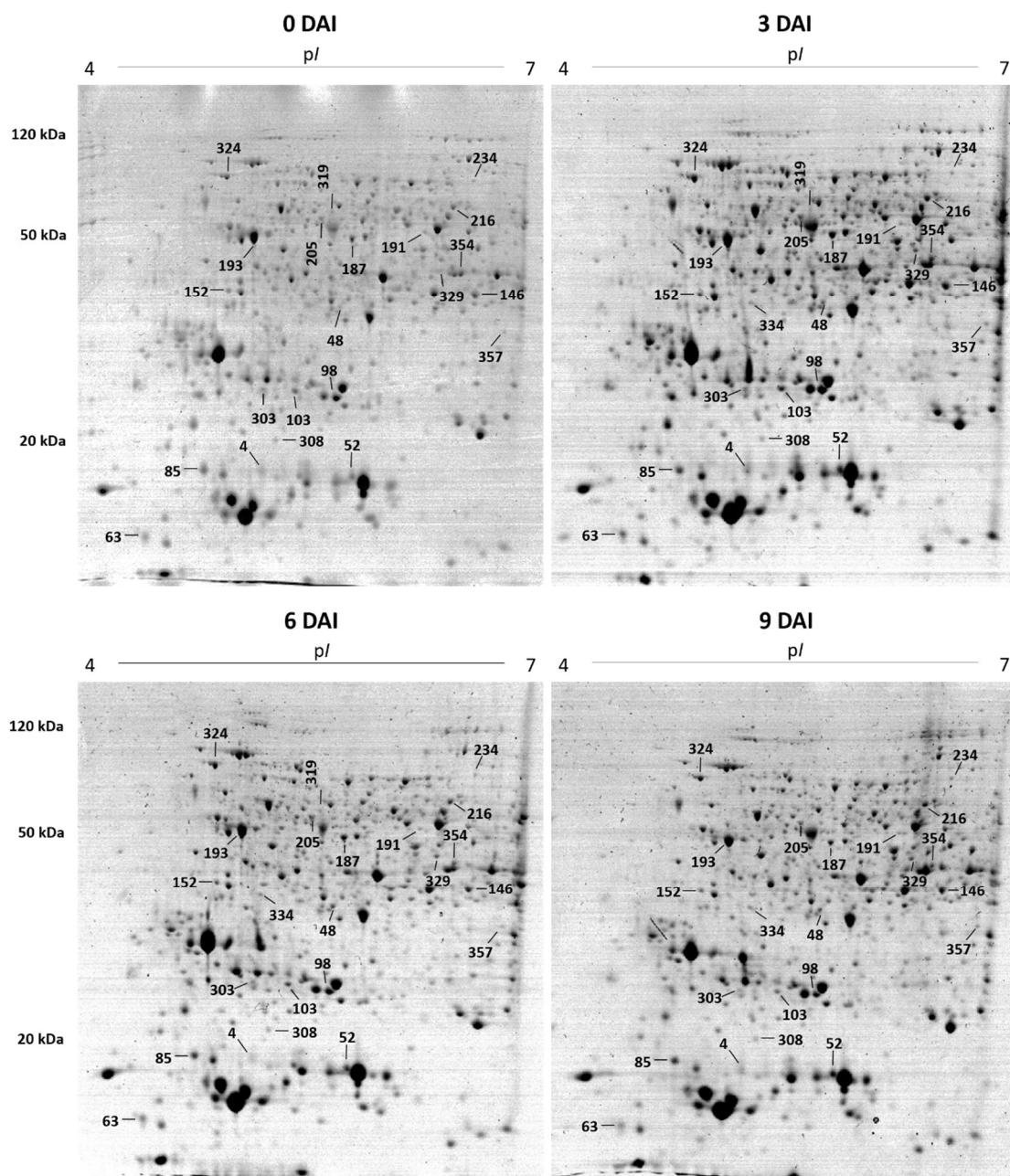


Figura 12 - Mapas comparativos em 2D de raízes de plantas de *A. stenosperma* controle (0 DAI) e inoculadas (3, 6 e 9 DAI) com *M. arenaria*, mostrando proteínas diferencialmente abundantes (DAPs $p \leq 0,05$) estatisticamente avaliadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05.

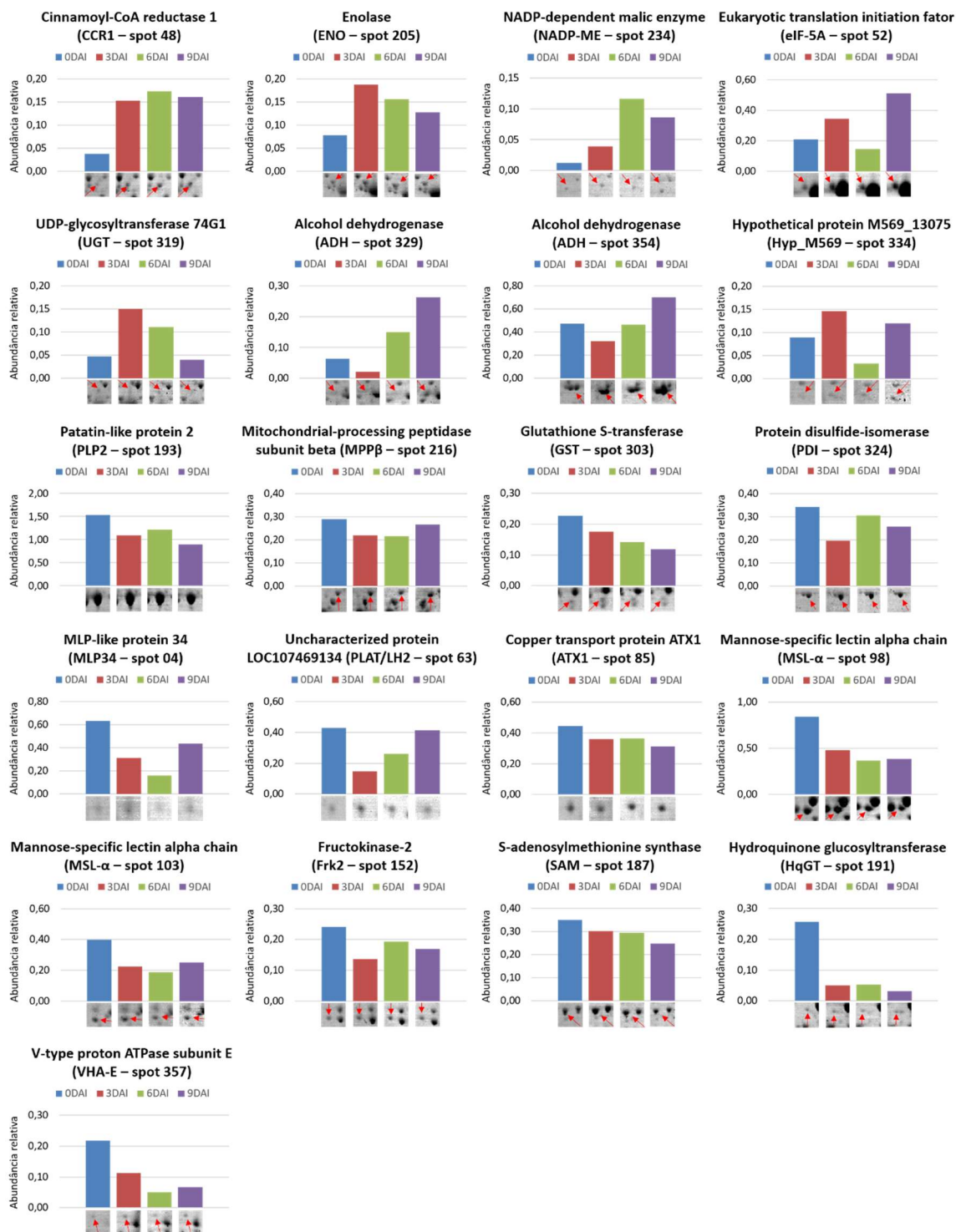


Figura 13 – Perfil de abundância das 21 DAPs identificadas pela técnica de 2-DE em raízes de plantas de *A. stenosperma* inoculadas (3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (0 DAI) com *M. arenaria*. Eixo(Y): representa a abundância relativa (expressa pela % do volume do *spot* determinado pelo programa ImageMaster 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.FVIGGPHGDAGLTLGR.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</i>	BAK00029.1	50		5,65		70	4/1	0,19
			<i>subsp. Vulgares</i>								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</i>	XP_002870533.1	74	15	6,02	4,49	87	15/13	0,43
			<i>subsp. lyrata</i>								0,15
	Uncharacterized protein LOC107469134 (PLAT/LH2)	K.LYDQYGYGIYIK.N	<i>Arachis duranensis</i>	XP_015944000.1	23		6,05		72	5/1	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.CHFVGDIDIFTAK.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.TITKDHQLQNYIQTHYTAPR.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.FSGEEYENFIALAEK.L K.LRSDYDFGHTLEAK.H K.FIEDSSIPVVTVFNNDPSNHPFVVK.F	<i>Arachis duranensis</i> <i>Arachis ipaënsis</i>	XP_015934571.1 XP_016163495.1	57 57	71	5,00 4,98	5,00	331 261	66/37 10/1 10/1 10/1	0,34 0,26 0,31 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.A + 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
191	Hydroquinone glucosyltransferase (HqGT)	-	<i>Arachis ipaënsis</i>	XP_016162634.1	52	49	5,93	6,31	111	38/17	0,16 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
103	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	5,51	116 394	76/12 31/1 31/1 31/1 31/1 31/1	0,42 0,22 0,19 0,25
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), glutational 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).

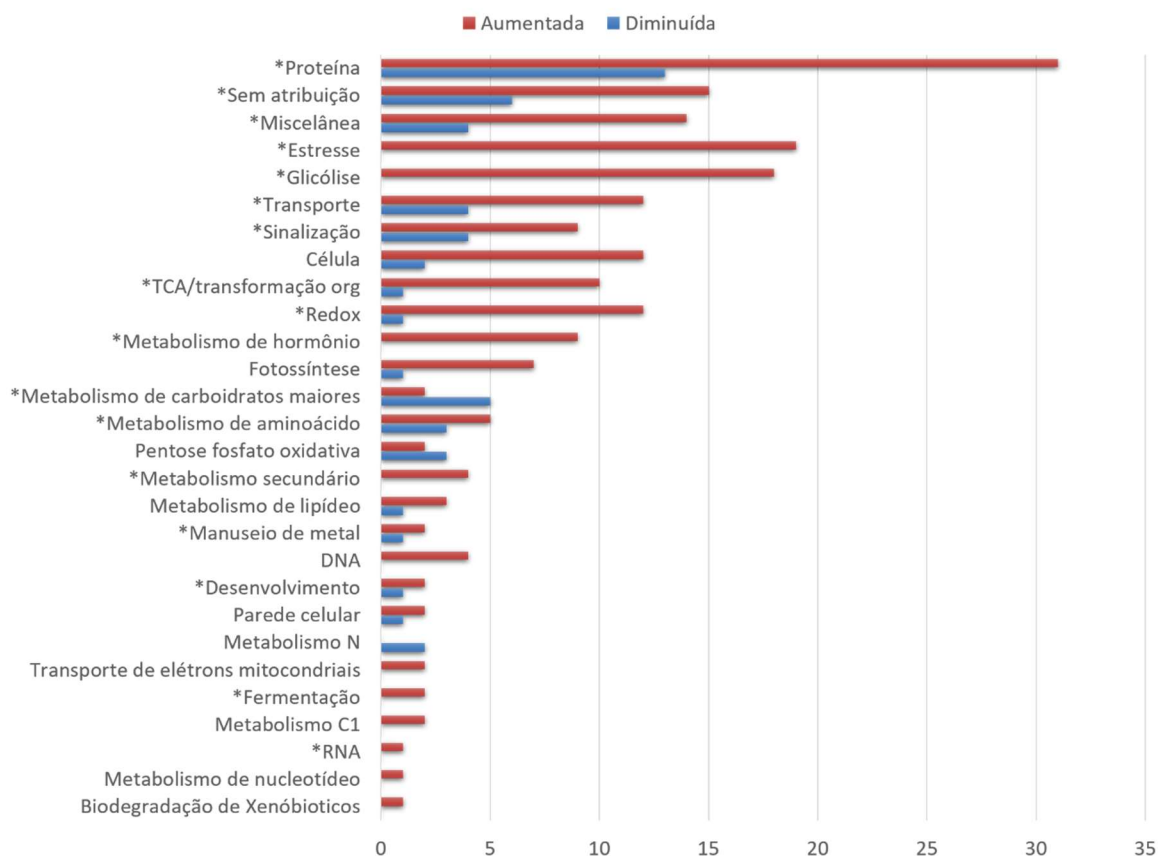


Figura 14 - Visão geral de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E e classificadas em 28 categorias funcionais hierarquicamente organizadas (BINs) pela ferramenta de anotação de sequências - Mercator. (*) Categorias funcionais com DAPs também identificadas na análise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

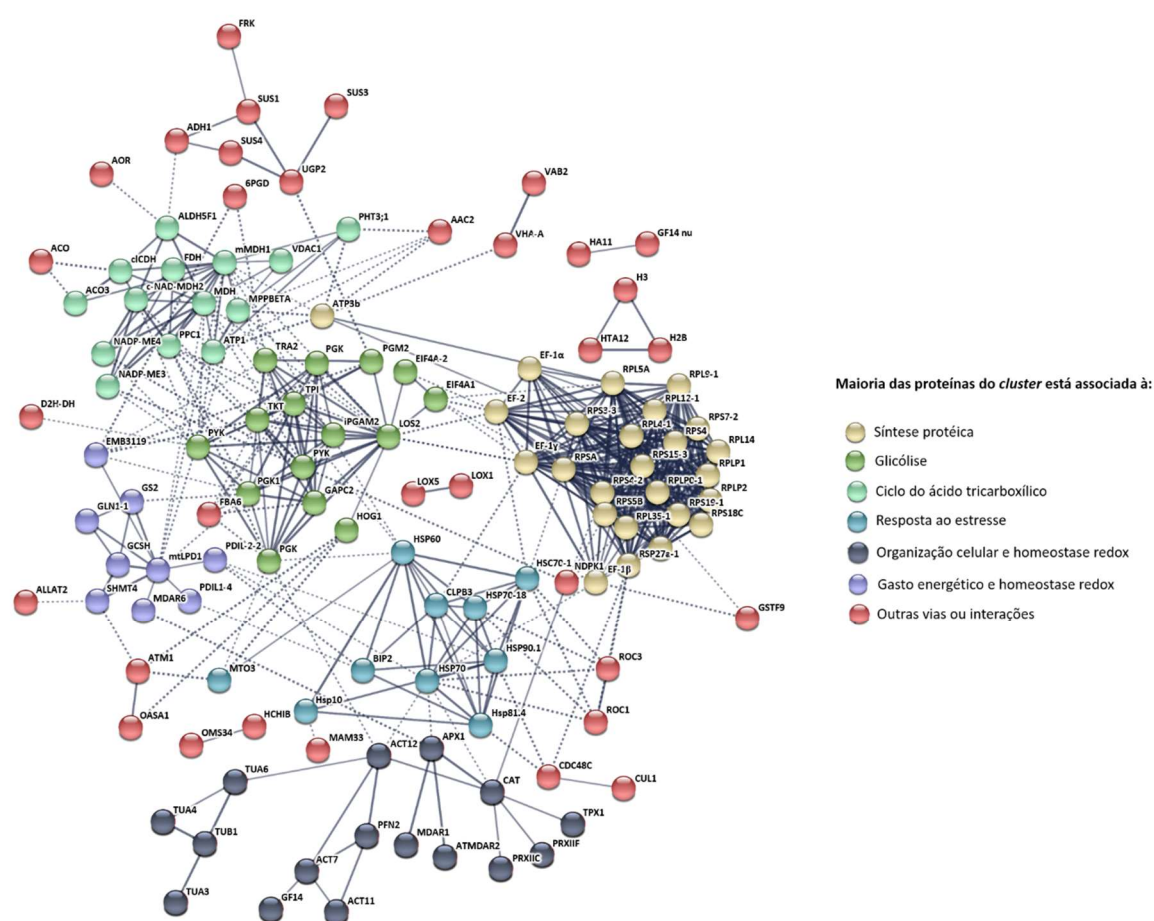


Figura 15 - Redes de interações proteína-proteína identificadas a partir de raízes de *A. stenosperma* inoculadas e não inoculadas com *M. arenaria*.

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.

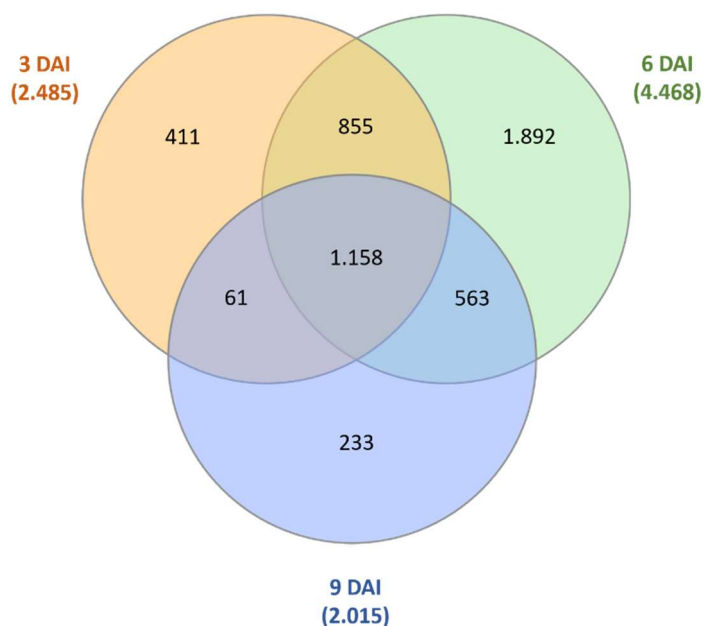


Figura 16 – Diagrama de Venn com a distribuição dos genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR $\leq 0,05$) em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (3, 6 e 9 DAI) em relação as raízes não inoculadas (0 DAI) com *M. arenaria*. DAI – dias após a inoculação. Diagrama gerado conforme Heberle et al., 2015.

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).

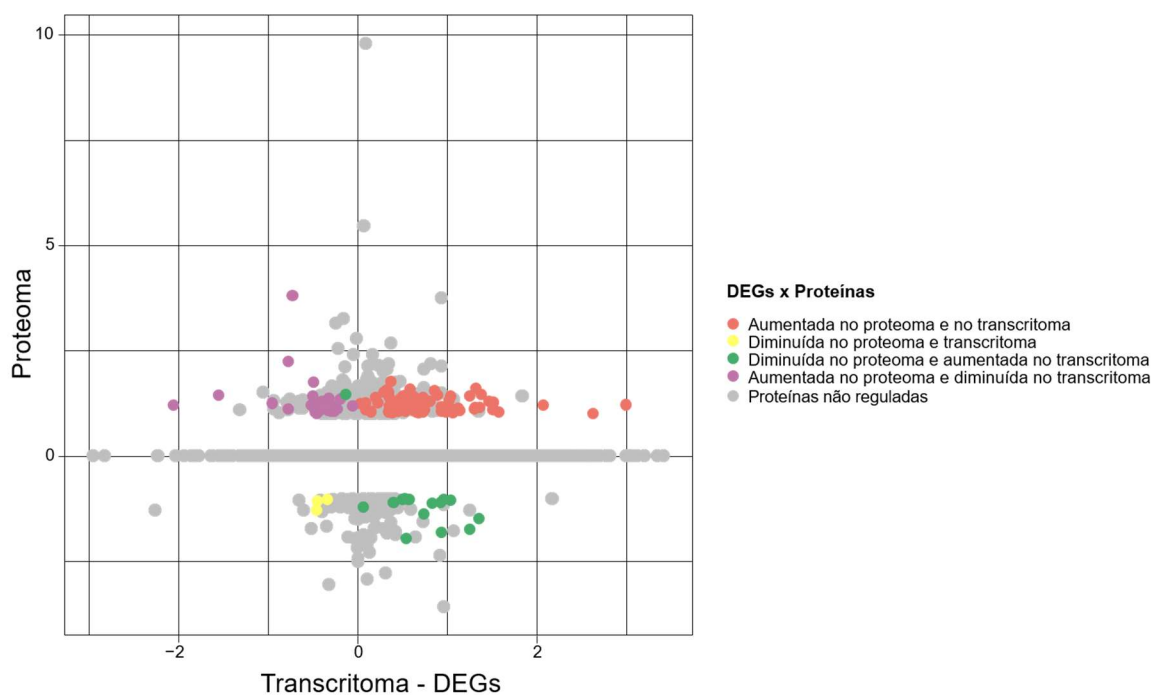


Figura 17 – Sobreposição de proteínas identificadas por 2D-NanoUPLC-MS^E e de genes diferencialmente expressos (DEGs – FDR ≤ 0,05) por RNA-Seq.

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	AAGCCTTGTTTTCAAGGCTCA	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	CCCCTGTGAGTGTGATCCT	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).

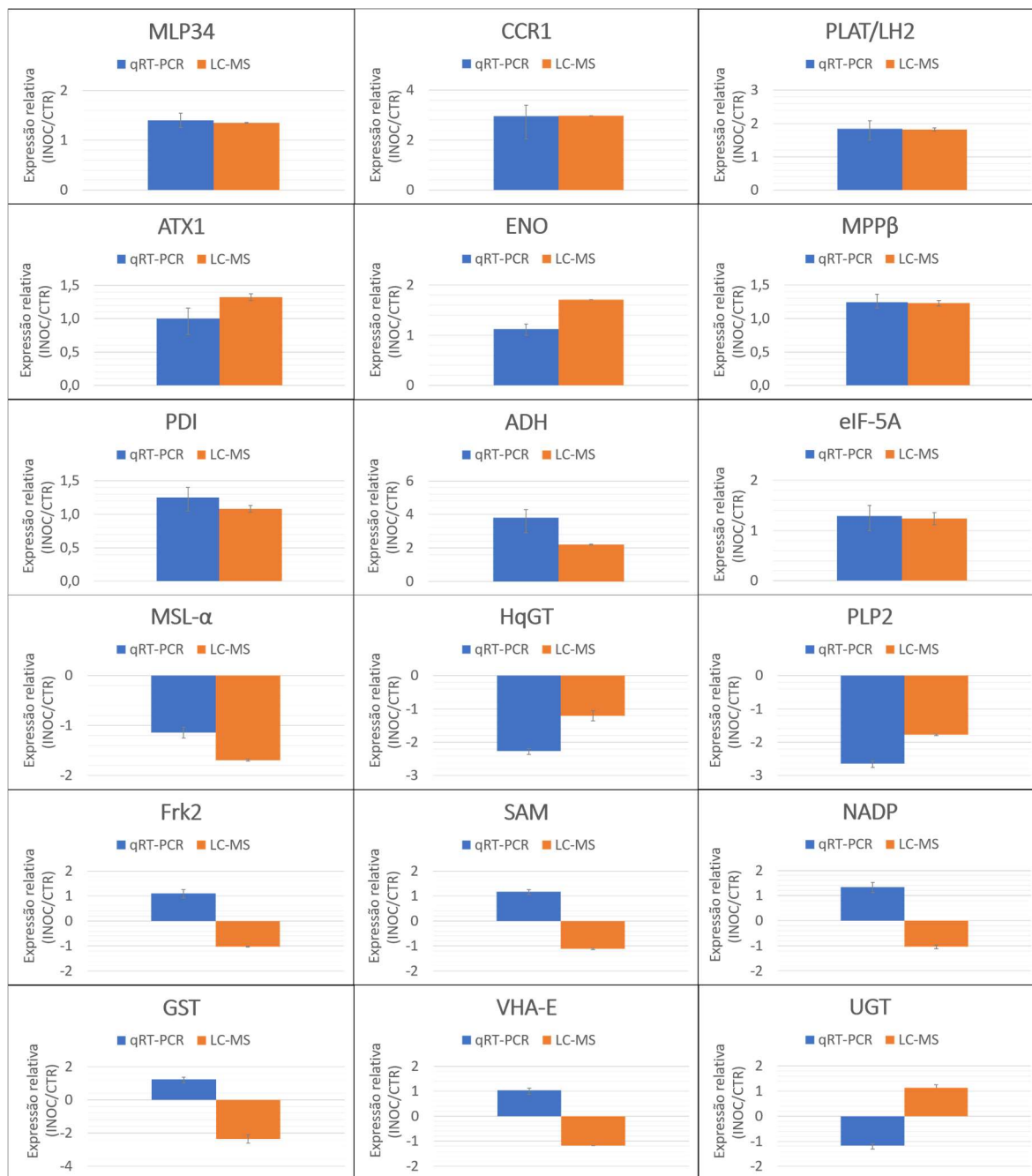


Figura 18 - Visão geral da expressão gênica e abundância proteica de 18 DAPs identificadas em raízes de *A. stenosperma* inoculadas (INOC - 3, 6 e 9 DAI) e não inoculadas (CTR - 0 DAI) com *M. arenaria*. Os gráficos representam a variação da expressão diferencial dos genes putativos que codificam estas 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 transcritômicos 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., 2012a; Kumar e Kirti, 2015; 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 e Marcotte, 2012).

A combinação de duas abordagens proteômicas (2-DE e 2D-NanoUPLC-MS^E) possibilitou a identificação de 222 DAPs envolvidos na resposta de *Arachis* ao nematoide das galhas, que foram relacionados à síntese, degradação, dobramento e modificações pós-traducionais necessárias para a manutenção de funções fisiológicas celulares e homeostase redox. Mais interessante, os DAPs relacionados à defesa e resposta ao estresse, como as proteínas lectinas do tipo L contendo o domínio receptor quinase (LecRKs) que se sabe estarem associadas à imunidade basal, também foram identificadas. Estas proteínas estão envolvidas com o reconhecimento de padrões moleculares associados a nematóides (NAMPs) e ativação do sistema imunológico basal da planta ou imunidade desencadeada por patógenos (PTI) para proteger contra a invasão de nematóides (Choi e Klessig, 2016). Além disso, um segundo grupo de DAPs capazes de reconhecer NAMPs e efetores de nematóides, o de proteínas contendo o domínio 14-3-3, também foi identificado. No entanto, essas moléculas estão envolvidas no desencadeamento de respostas do tipo ETI, que são mais específicas e podem levar à HR. Essas proteínas também estão envolvidas na regulação das vias metabólicas hormonais importantes na resposta de defesa contra o nematoide das galhas, como o ácido jasmônico e o ácido salicílico (Luo et al., 2017; Camoni et al., 2018).

Além das moléculas implicadas na detecção do patógeno, as proteínas envolvidas na transdução de sinais através de modificações pós-traducionais ou interações proteína-proteína podem ter um efeito regulador significativo nas respostas de defesa (Haider e Pal, 2013; Chen et al., 2015; Zhou et al., 2016, Stare et al., 2017). Entre outros, a fosforilação de proteínas, ubiquitinação, SUMOilação e S-nitrosilação são considerados os principais mecanismos para a transmissão de sinais de estresse (Spoel e Loake, 2011; Yu et al., 2012; Vierstra, 2012; Guerra et al., 2015; Withers e Dong, 2017; Vega et al., 2018). Neste estudo, entre várias proteínas associadas às vias reguladoras de proteínas, proteínas ribossomais (RPs) foram identificadas como DAPs. As RPs fazem parte do maquinário

responsável pela síntese proteica e também estão envolvidas na sinalização de estresse, resistência a doenças (Moin et al., 2016; Nagaraj et al., 2016; Gong et al., 2017) e estímulos ambientais (Wu et al., 2015; Merchante et al., 2017). Da mesma forma, dois fatores de iniciação da tradução eucariótica (eIFs), eIF4A e eIF5A, apesar das tendências de expressão contrária, mostraram modulação diferencial em resposta à infecção por *M. arenaria*. Ambas as proteínas participam do processo inicial de tradução de proteínas, mas enquanto o EIF4A estimula as vias induzidas pelo estresse que medeiam a tolerância ao estresse abiótico (Tuteja et al., 2014; Rao et al., 2017), EIF5A desempenha um papel importante no desenvolvimento da planta, respostas de estresse e morte celular induzida por patógenos (Ren et al., 2013; Que et al., 2015; Wang et al., 2016b).

No geral, verificou-se que as proteínas relacionadas à defesa classificadas na categoria de estresse foram mais abundantes sob a infecção por nematóides do que nas plantas controle. Estas incluem proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas PR), tais como proteínas semelhantes a taumatinas (TLPs - PR-5), peroxidases (PDO - PR-9), proteínas do tipo MLP (MLPs - PR-10) e proteínas endoquitinase (ECP - PR-3, 4, 8 ou 11).

Uma dessas proteínas PR, a proteína tipo MLP 34 (AsMLP34), foi consistentemente mais abundante nas amostras inoculadas com *M. arenaria* do que no controle. Essas proteínas MLP (*Major Latex Protein*) pertencem a uma subclasse da família Bet v I (PR-10), que desempenha importantes papéis na defesa contra patógenos e tolerância ao estresse ambiental (Liu e Ekramoddoullah, 2006; Wang et al., 2016a; Carmo et al., 2019). Diversos estudos sugeriram a função dos genes MLP na proteção contra fungos e vírus (Schenk et al., 2000; Malter e Wolf, 2011; Wang et al., 2011; Chen et al., 2015; Yang et al., 2015). No entanto, o efeito de sua superexpressão na resistência a patógenos em plantas varia de acordo com o gene MLP específico utilizado, como observado para diferentes genes MLPs de algodão contra *Verticillium dahliae* (Yang et al., 2015; Zhang et al., 2012a; Wang et al., 2011, Chen e Dai, 2010).

Três proteínas tipo MLP-34 (AsMLP34) foram identificadas neste estudo, como mais abundantes em amostras inoculadas com *M. arenaria*, em comparação a amostras controles, usando 2D-NanoUPLC-MS^E. Uma dessas isoformas, além de ser identificadas nas duas abordagens proteômicas utilizadas, foi consistentemente induzida na análise de 2D-NanoUPLC-MS^E e transcrito (RNA-Seq e RT-qPCR) e selecionada para análise dos efeitos da sua superexpressão *in planta* durante o processo de infecção do nematoide.

Os eventos moleculares que governam a participação de MLPs na defesa de plantas ainda não estão claros. Entretanto, sua indução por infecção de patógenos foi observada em tecidos de raiz e hipocótilo de algodão em resposta à infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Dowd et al., 2004), em eucalipto infectado com *Calonectria pseudoreteauidii* (Chen et al., 2015), e também em resposta a moléculas sinalizadoras de

defesa, como etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico, o que reforça seu papel na resposta a estresses bióticos. Portanto, estudos que visem à identificação de genes possivelmente modulados pela superexpressão de *AsMLP34* são necessários para esclarecer seu papel na resposta de defesa de *A. stenosperma* contra *M. arenaria*.

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 (Gassmann et al., 2016). 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 muitos 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 para introgressão de novas características genéticas (Chu et al., 2014; Liu et al., 2016). Alguns genes individuais que conferem características agrônômicas 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 e Sankara, 2001; Sharma e 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.

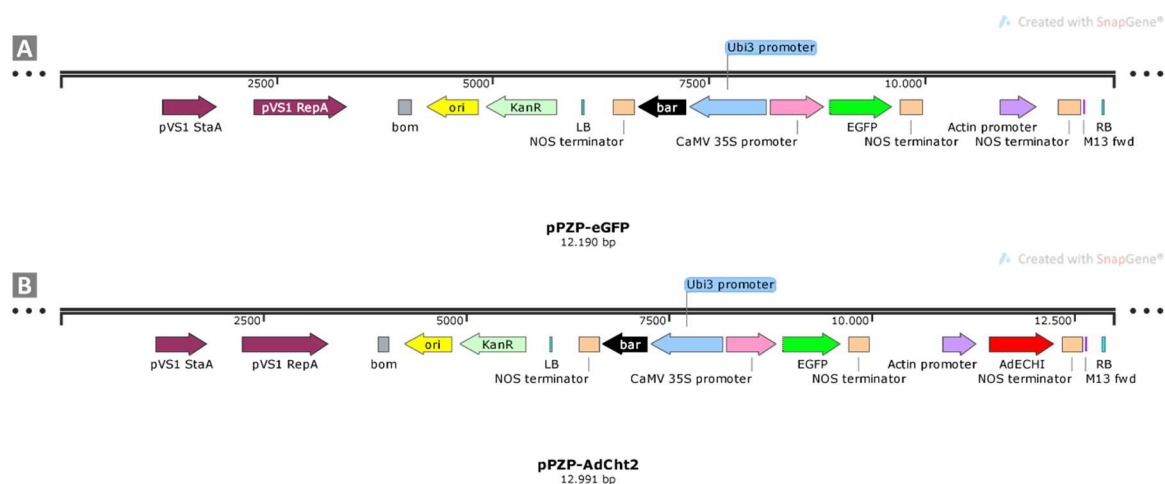
2. MATERIAL E MÉTODOS

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)

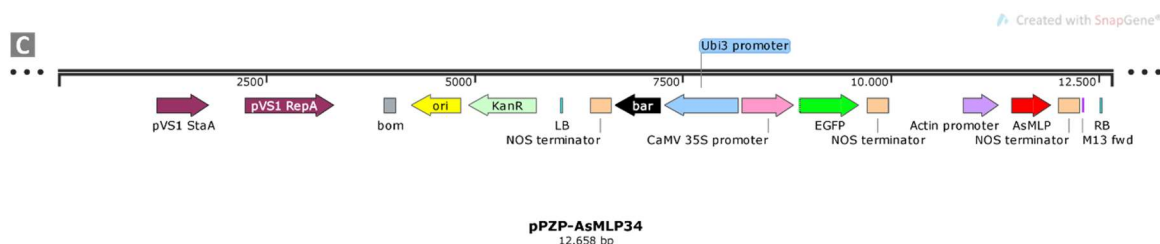


Figura 19 - Mapas dos vetores. A) pPZP_201BK_EGFP. B) pPZP-AdCht2. C) pPZP-MLP34. Imagem criada pelo SnapGene®.

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 a fim 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 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 essa 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 as demais plantas tiveram sua irrigação suspensa até o fim do experimento, quando da morte das mesmas. O experimento durou 13 dias. As plantas foram monitoradas de dois em dois dias, para acompanhamento da perda de água do solo, registrado, gravimetricamente, por sua pesagem.

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).

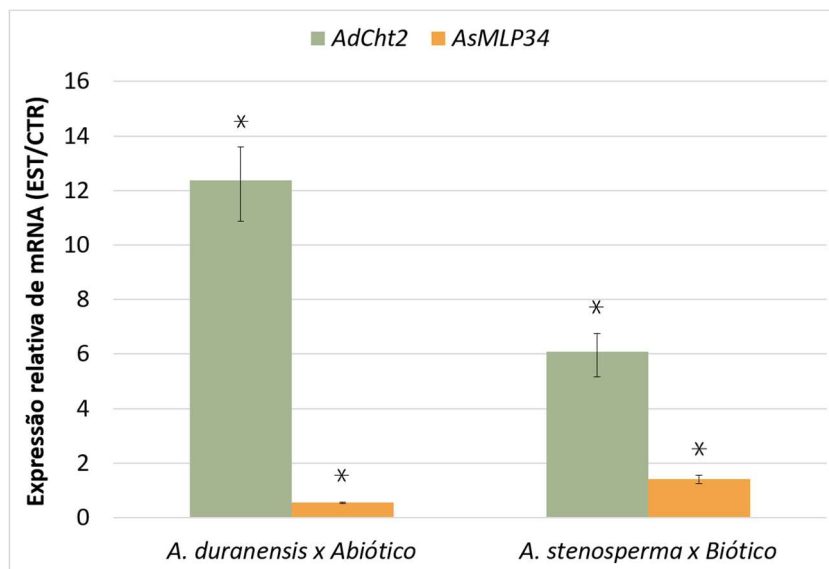


Figura 20 - Gráfico de expressão relativa dos genes candidatos selecionados para superexpressão em plantas transgênicas. A esquerda: nível de expressão de *AdCht2* e *AsMLP34* em raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico. **A direita:** nível de expressão de *AdCht2* e *AsMLP34* em raízes 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 pZP-AdCht2 e pZP-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.

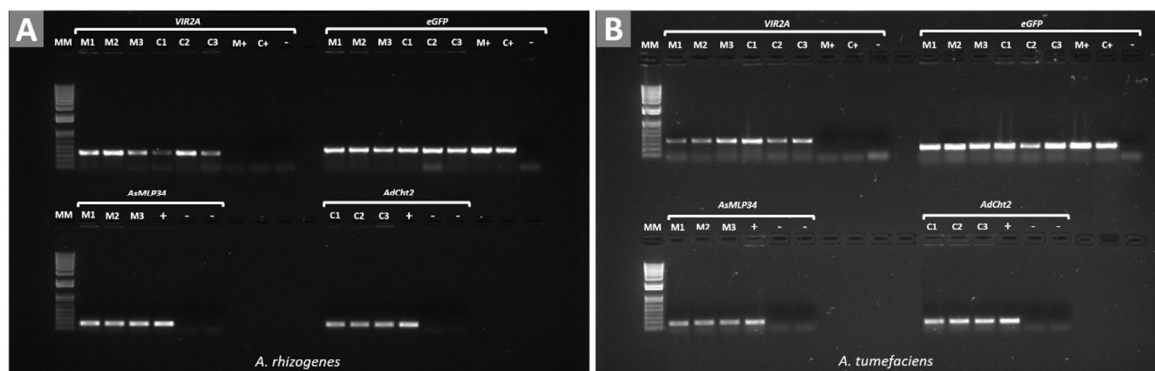


Figura 21 – Gel de agarose (1,5%) com os produtos de amplificação por PCR de colônia para confirmação da transformação das Agrobactérias com os vetores pPZP-AsMLP34 e pPZP-AdCht2, utilizando os primers para os genes de virulência (*VIR* - 338pb), *eGFP* (350pb), *AsMLP34* (198pb) e *AdCht2* (173pb). **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.

3.3. Transformação de folhas destacadas de *Arachis* com os genes candidatos 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 DAJ 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).

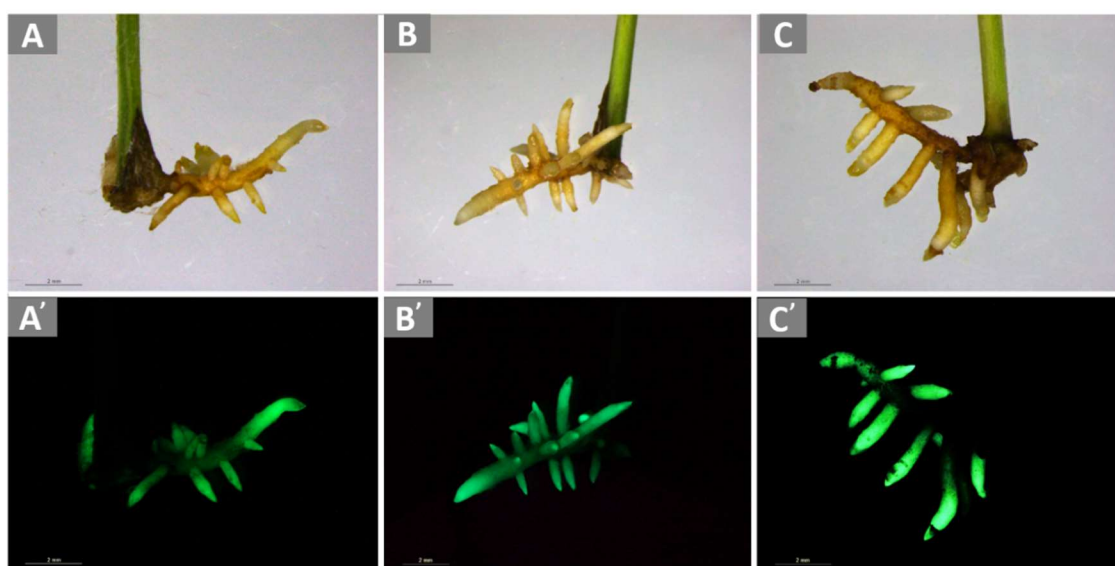


Figura 22 - Imagens ilustrativas de raízes transgênicas induzidas por *A. rhizogenes* em folhas de amendoim e o efeito da superexpressão dos genes *eGFP*, *AsMLP34* e *AdCht2* na quantidade de galhas por grama de raiz avaliada. **A-C)** Folhas destacadas de amendoim com raízes transgênicas em cabeleira

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.

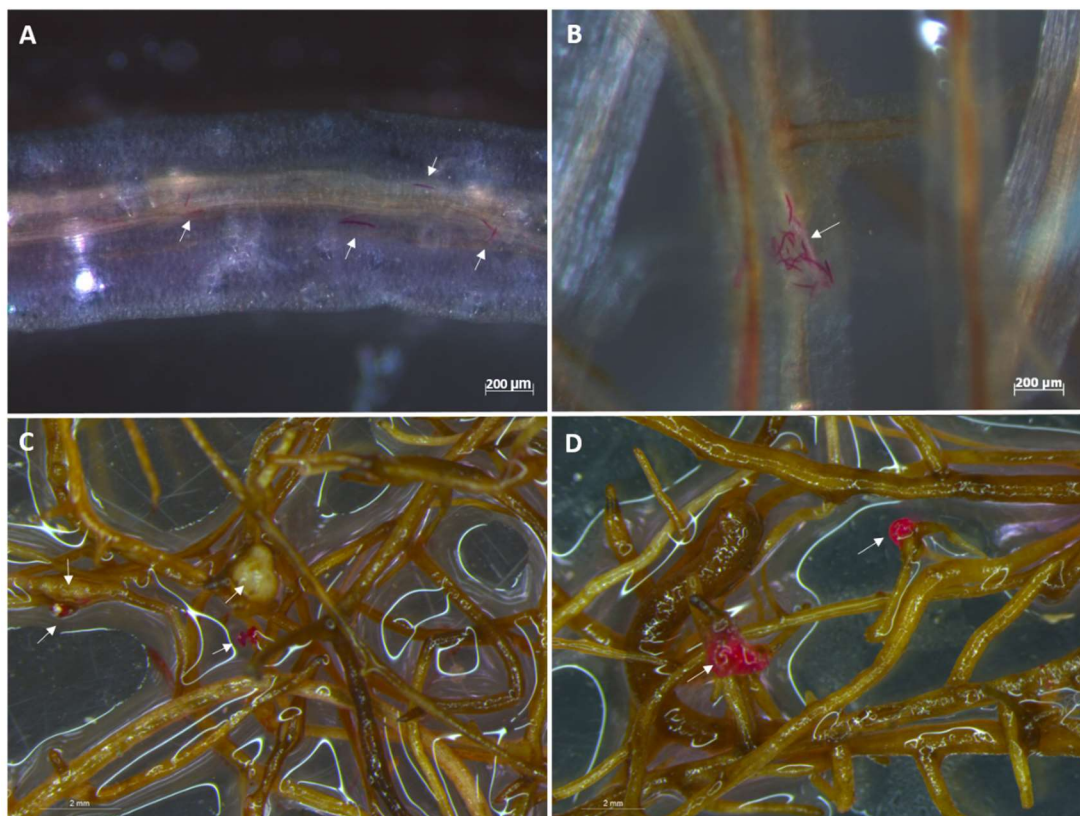


Figura 23 - Infecção por *M. arenaria* raça 1 em raízes transgênicas (pZP-eGFP) induzidas por *A. rhizogenes* a partir de folhas destacadas de *A. hypogaea*, por meio do processo de coloração dos nematoides com fucsina ácida e das massas de ovos com floxina B. (A-B) Juvenis do estágio 2 (J2), corados 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.

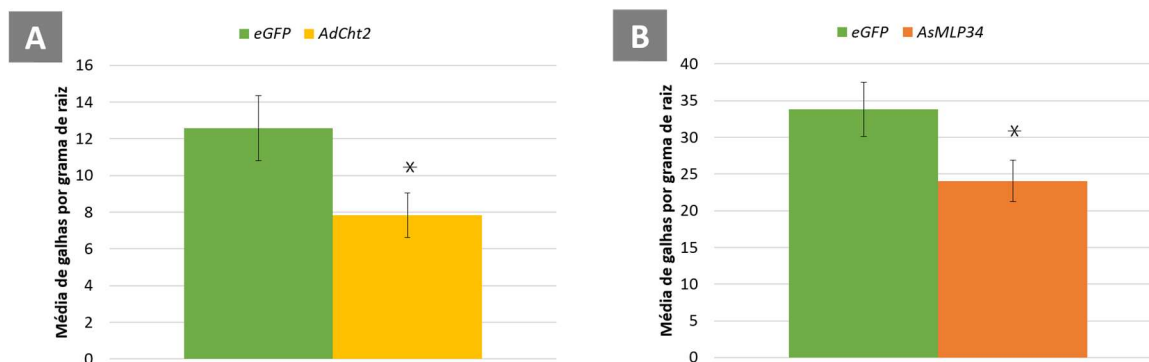


Figura 24 - Gráficos comparativos com o número médio de galhas por grama de raízes transgênicas obtidas a partir de folhas destacadas de amendoim. A) Valores médios obtidos a partir de raízes transformadas com pZP-eGFP e pZP-AdCht2. B) Valores médios obtidos a partir de raízes transformadas com pZP-eGFP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

3.4. Transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana* com os genes candidatos 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).

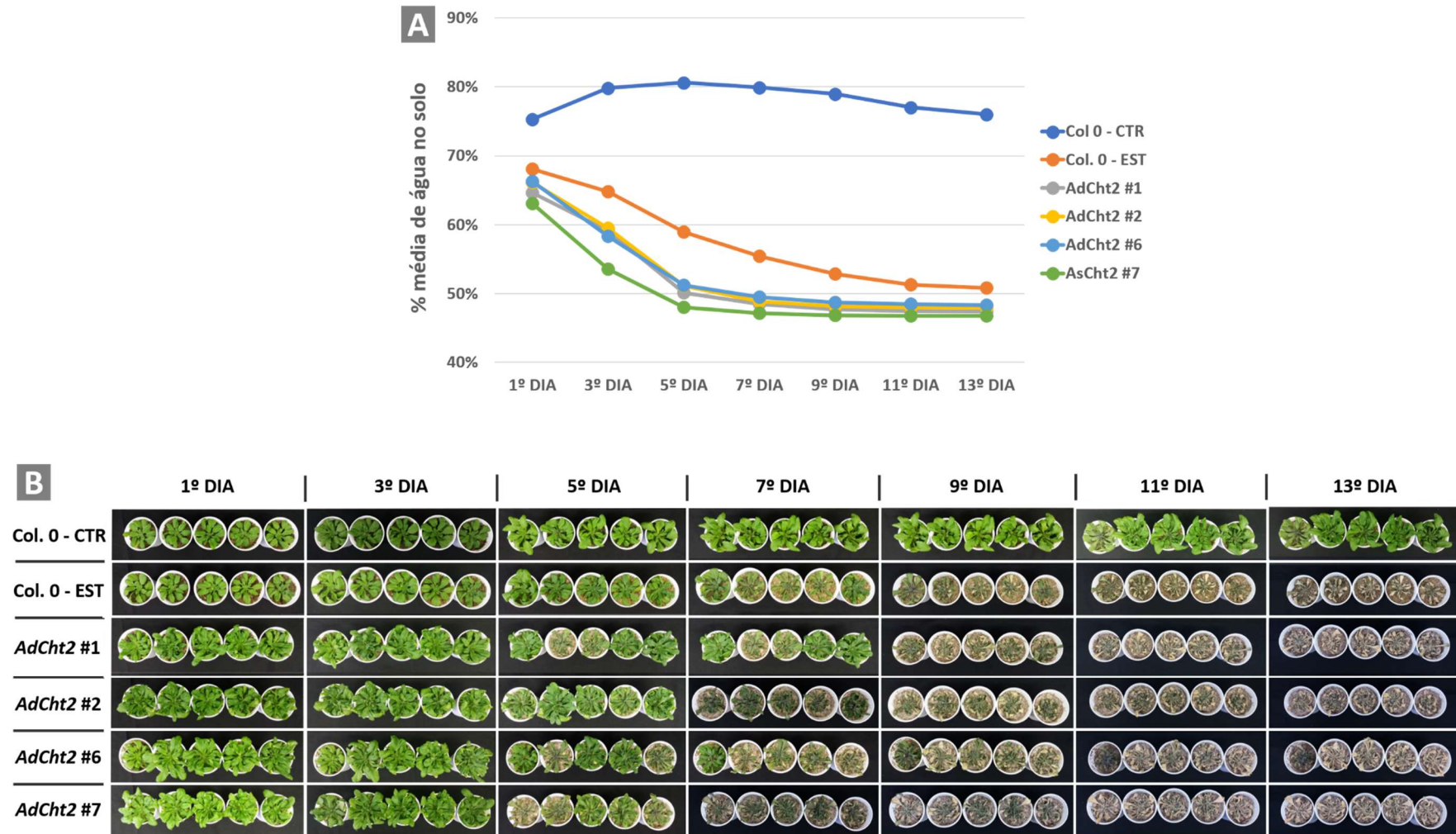


Figura 25 – Plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *AdCht2* submetidas à diminuição gradual de água no solo (*dry-down*). A) Porcentagem média de água no solo durante os 13 dias de experimento de *dry-down*. B) Visão geral do fenótipo da parte aérea de plantas transformadas (*AdCht2*) e não 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 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 (2016b) 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 (Dowd 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. 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.
- Akram, N. A., Shafiq, F., Ashraf, M. (2018). Peanut (*Arachis hypogaea* L.): A prospective legume crop to offer multiple health benefits under changing climate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5):1325-1338.
- 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*, 19:1648.
- 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., Kochanovski, 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.
- 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.
- Barbary, A., Djian-Caporalino, C., Marteu, N., Fazari, A., Caromel, B., Castagnone-Sereno, P. and Palloix, A. (2016). Plant genetic background increasing the efficiency and durability of major resistance genes to root-knot nematodes can be resolved into a few resistance QTLs. *Frontiers in Plant Science*, 7:632.
- 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.
- 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.
- 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 ipaënsis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature Genetics*, 48(4):438-446.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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., Starr, 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.
- Bybd, D. W., Kirkpatrick, T., Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues 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 pseudoreteaudii*. *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.
- Chmielewska, K., Rodziewicz, P., Swarcewicz, B., Sawikowska, A., Krajewski, P., Marczak, Ł., Ciesiołka, D., Kuczyńska, A., Mikołajczak, K., Ogradowicz, 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. (2000). High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta*, 210(2):195-204.
- Choi, H. W., Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 16(1):232.
- 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.
- 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 das Safras – 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>.
- 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., Peñaloza, A. P. S., Valls, J. F. M. (2005). Further cytogenetic information on *Arachis stenosperma* (Leguminosae). *Cytologia*, 70(3):331-335.
- 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 (*Gossypium herbaceum* 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.
- 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. *Vasinfestum*. *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.
- Dwivedi, S. L., Puppala, N., Maleki, S. J., Ozias-Akin, P., Ortiz, R. (2014). Peanut improvement for human health. In: Janick, J. (Ed.), *Plant breeding reviews*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Vol. 38, pp. 141-183.
- 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. (Eds.), *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., pp. 157-173.
- 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., 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., Vello, N. A. (2006). Study of evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis* and *A. hypogaea*. *Crop Science*, 46(4):1546-1552.
- Fernández, A., Krapovickas, A. (1994). Cromosomas y evolution en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8(1-4):187-220.
- 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.
- 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.
- Gassmann, W., Appel, H. M., Oliver, M. J. (2016). The interface between abiotic and biotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 67(7):2023-2024.
- 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.

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

- 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.
- 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 photoinhibition. *Molecular Plant*, 8(9):1304-1320.
- 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. *Current Genomics*, 14(2):91-110.
- 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.
- 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., Timper, P., Culbreath, A. K., Kvien, C. K. (2008a). Registration of 'Tifguard' peanut. *Journal of Plant Registrations*, 2(2):92-94.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathology*, 54(2):93-99.
- 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. (2016a). 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.
- Jeandroz, S., Lamotte, O. (2017). Editorial: Plant responses to biotic and abiotic stresses: lessons from cell signaling. *Frontiers in Plant Science*, 8:1772.
- 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., Castilejo, M. A., Curto, M. (2006). Proteomics: a promising approach to study biotic interaction in legumes. A review. *Euphytica*, 147(1-2):37-47.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 hypoagaea* (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.

- 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. (2015). 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, 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.
- Lacorte, C., Romano, E. (2015). 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, pp. 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.
- 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., 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., 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.
- Lecoq, 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.
- 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.
- 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.
- 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. Apostila online. Acessado em outubro de 2017. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/02f8/e1be2701f9d35393036fbc9cc7f1e8d819a2.pdf>.
- 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.
- 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.
- 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. (2010). 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.

- 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.
- Merchante, 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.
- 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.
- 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., Gollery, M. Shulaev, V., Van Breusegem, F. (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.
- 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.
- 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.
- Motsinger, R., Crawford, J., Thompson, S. (1976). Nematode survey of peanuts and cotton in southwest Georgia. *Peanut Science*, 3:72-74.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pavlović, I., Petřík, I., Tarkowská, D., Lepeduš, H., Vujčić Bok, V., Radić Brkanac, S., Novák, O., Salopek-Sondi, B. (2018). Correlations between phytohormones and drought tolerance in selected *Brassica* crops: chinese cabbage, white cabbage and kale. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10): pii: E2866.
- 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.

- Petriz, 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.
- 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.
- 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.
- 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, 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Ruperti, 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.

- 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.
- 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.
- 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, pp. 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., 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, 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.

- 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.
- 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., Tallury, S. P., Seijo, G. R., Leal-Bertioli, 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):14.
- Su, Y., Xu, L., Wang, S., Wang, Z., Yang, Y., Chen, Y., Que, Y. (2015). Identification, phylogeny, and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Scientific Reports*, 5:10708.
- 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: Singh D., Singh H., Prabha R. (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi, 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.
- Tomaszewski, E. K., Khalil, M. A. M., El, D. A. A., Powers, T. O., Starr, J. L. (1994). *Meloidogyne javanica* parasitic on peanut. *Journal of Nematology*, 26:436-441.
- Toomer, O. T. (2017). Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea*). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 1-12.
- 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 (2019a). *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 (2019b). *World Agricultural 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 trifoliolate 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.
- 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.
- 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.
- von Mende, N. (1997). Invasion and migration behavior of sedentary nematodes. In: Fenoll, C., Grundler, F. M. W., Ohl, 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., Snel, B. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Research*, 31(1):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. (2017a). History and Impact of the International Peanut Genome Initiative: The Exciting Journey Toward Peanut Whole-Genome Sequencing. In: Varshney, R. K., Pandey, M. K., Puppala, N. (Eds), *The Peanut Genome*. Cham: Springer International Publishing, pp. 117-133.
- Wang, L., Huang, G-Q., Sun, Y., Li, Y., Yao, W-J., Jiang, T-B. (2016b). Cloning and expression analysis of eIF-5A gene in *Apocynum venetum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(4):677-684.
- Wang, M., Zou, Z., Li, Q., Sun, K., Chen, X., Li, X. (2017b). The *CsHSP17.2* molecular chaperone is essential for thermotolerance in *Camellia sinensis*. *Scientific Reports*, 7:1237.
- Wang, Y., Yang, L., Chen, X., Ye, T., Zhong, B., Liu, R., Wu, Y., Chan, Z. (2016a). 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. (2012a). 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.
- 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.
- 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.
- Xing, X., Chen, H. (2015). Determination of the pharmaceutically active components in peanut shells by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytical Letters*, 48(7):1089-1098.

- 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.
- 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, 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, 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, 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.
- Yuan, W., Holbrook, C. C., Chu, Y., Ozias-Akins, P., Dickson, D. W. (2018), Influence of temperature on susceptibility of cvs. Tifguard and Georgia-06g peanut to *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, 50(1):33-40.
- 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, 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. (2012a). 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.
- 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*, 39:82-90.
- 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.
- 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. *Emirates Journal of Food & Agriculture*, 24(1):57-72.
- 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

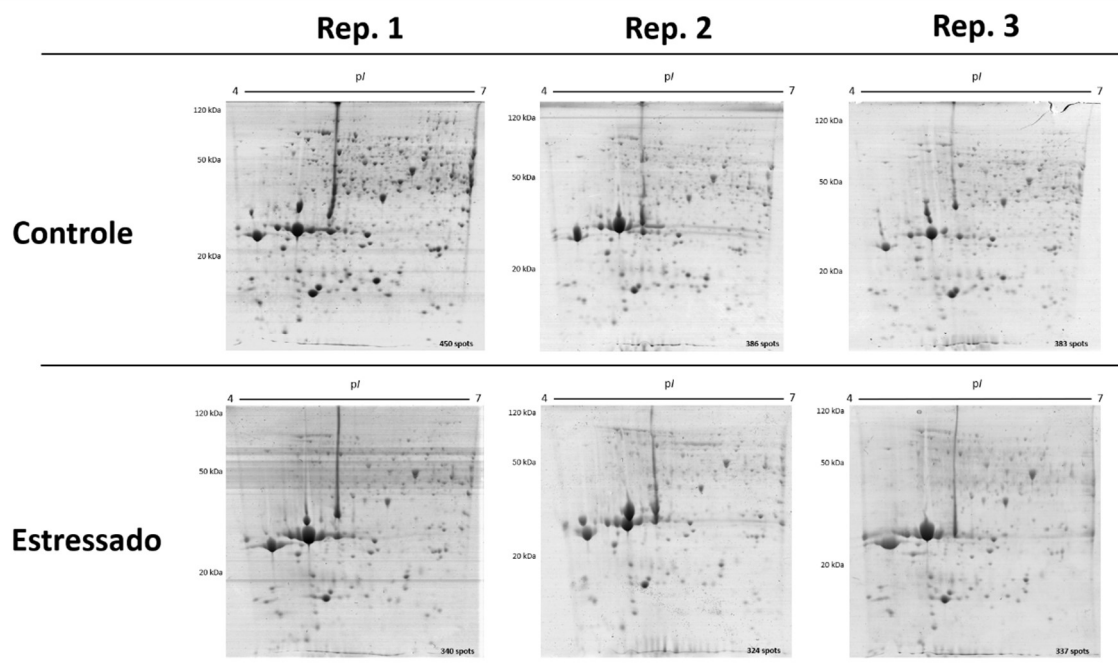


Figura Suplementar 1 – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico. Controle (NTR: 1,0); Estressado (NTR < 0,3).

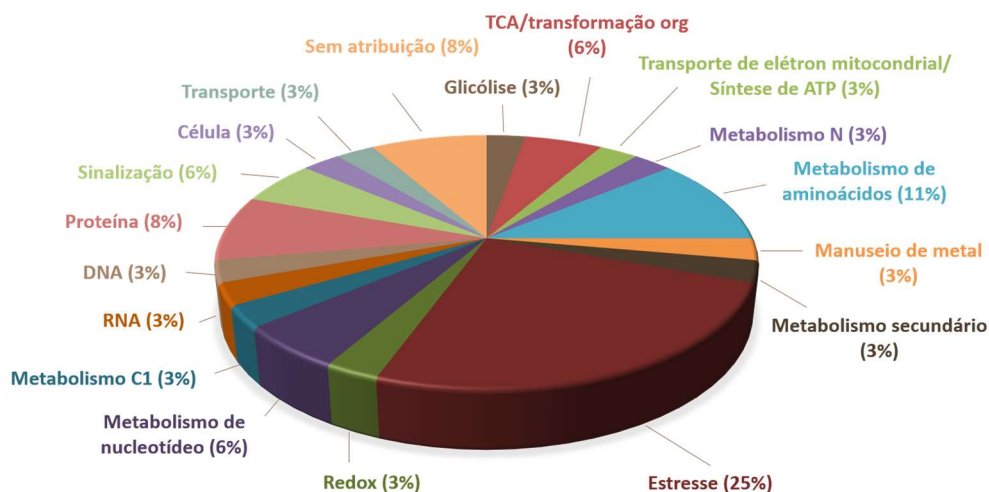


Figura Suplementar 2 - Visão geral da categorização funcional, usando a ferramenta de anotação de sequência Mercator, das 31 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) identificadas em raízes de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico.

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).

<i>ID do match</i>	<i>Contagem do match</i>	<i>Raiz controle*</i>	<i>Raiz estressada *</i>	<i>ANOVA</i>	<i>Fold Change¹</i>
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	Easell	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.

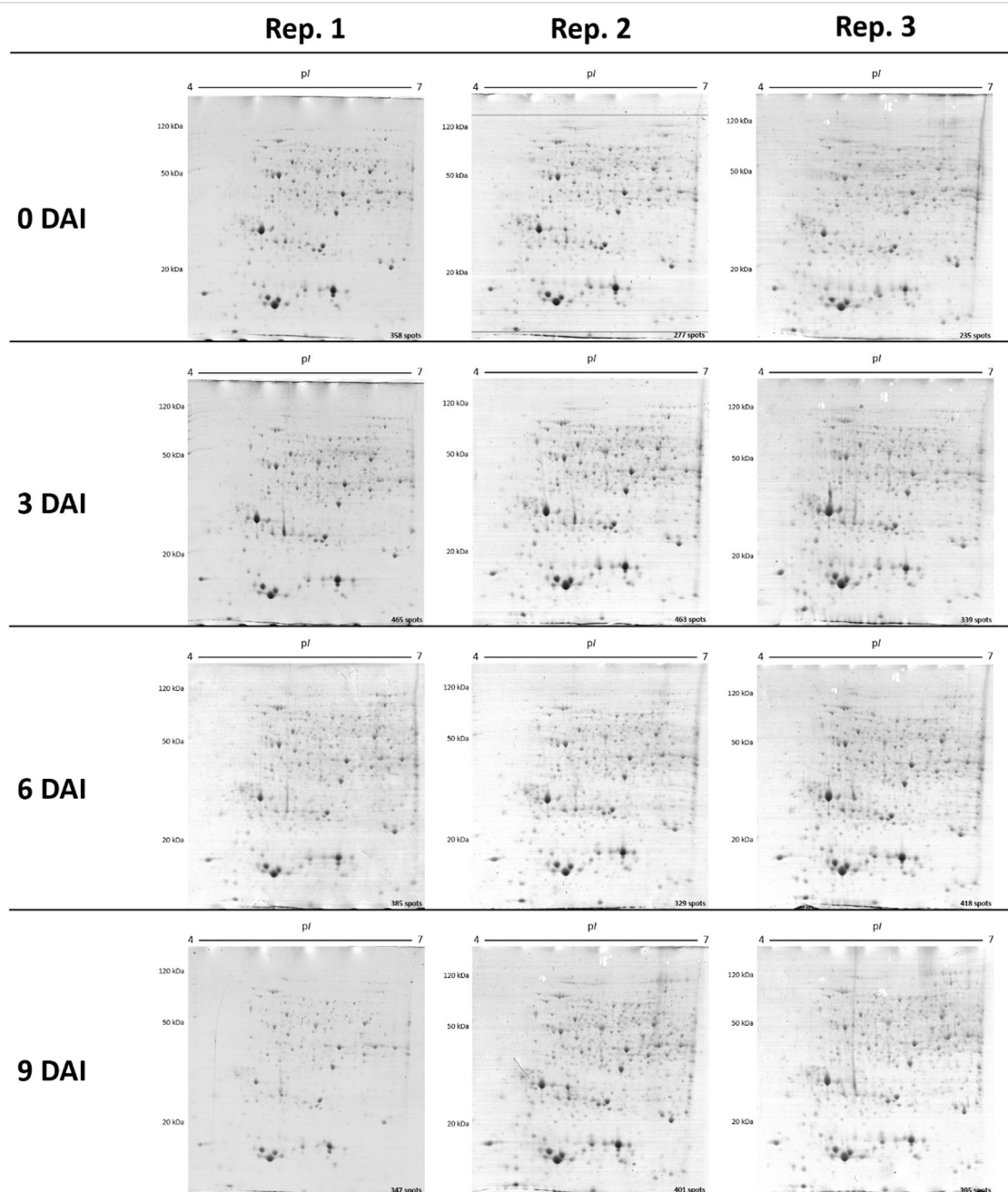


Figura Suplementar 3 – Replicatas técnicas dos mapas 2D de proteínas totais de raízes de *A. stenosperma* não inoculada (0 DAI) e inoculadas com *M. arenaria* (3, 6 e 9 DAI). DAI – dias após a inoculação.

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	Fold change - 6DAI	Fold change - 9DAI	Transcritômico ^e	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	84%	
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	94%	
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 (Pt	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, cytosol	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	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; Catalyzes the conjugation of glutathione to xenobiotics	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; Involved in detoxification of xenobiotics	61%
ASTER019077.115044	PREDICTED: Arachis duranensis epoxide hydrolase A-like (LOC107492465)	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	AT3G05600	alpha/beta-hydrolase domain protein	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 hydrogen peroxide	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 hydrogen peroxide	57%
ASTER034035.169969	PREDICTED: Arachis ipaensis peroxidase 15 (LOC107638830), mRNA	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	PA2	peroxidase 2; Removal of hydrogen peroxide	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 hydrogen peroxide	61%

(Continua na próxima página)



ID do transcrito e categoria funcional ^a	Anotação NCBI	Perfil CTR ^b	Perfil (DP) ^c	Perfil INOC ^b	Perfil INOC (DP) ^c	Fold change Proteômico ^d	Fold change 3DAI	Fold change 6DAI	Fold change 9DAI	ID proteína (String) ^e <i>Arabidopsis thaliana</i>	Anotação (String) <i>Arabidopsis thaliana</i>	Identidade (String) <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	ATP1	ATP synthase subunit 1; Mltc	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	MLP423	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	KTI.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	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	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	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	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	RPS28	40S ribosomal protein S28-1	85%
ASTER073759.264513	PREDICTED: Arachis ipaensis uncharacterized LOC107610305 (LOC107	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	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	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	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	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	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	RD21A	cysteine proteinase RD21a	68%
ASTER042883.195604	PREDICTED: Arachis duranensis cullin-1 (LOC107483629), transcript vi	INOC	INOC	INOC	INOC	INOC	-1,22669	-1,2477	-1,21389	CUL1	cullin 1; Involved in ubiquitin	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	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	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	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	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	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	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	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	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	AT1G09640	elongation factor EF-1 gamm	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	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	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	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 factor 4)	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 S5	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	0,98	0,03	0,98	0,03	1,00	1,03854	-1,10577	1,01431	RPL5A	ribosomal protein L5; Blinds to	84%	
ASTER031782.162667	PREDICTED: Arachis duranensis 60S ribosomal protein L9 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	0,63	0,04	1,36	0,04	2,16	1,27702	1,13347	1,11409	AT5G24510	large subunit ribosomal protei	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, cytosolic	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, chloroplast	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 (CHLNCDRAFT_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 (LOC107459025)	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 isomerase	CTR	CTR	CTR	CTR	CTR	1,33616	1,43941	1,32757	EMB3119	EMBRYO DEFECTIVE 3119	72%	
ASTER004400.36091	PREDICTED: Arachis duranensis transketolase, chloroplast (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, mitochondrial	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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), mitochondrial	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), mitochondrial	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 (LOC107459025)	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 dihydrolypyol dehydrogenase, mitoc	0,94	0,03	1,06	0,03	1,13	1,17802	1,1065	1,12499	mtLPD1	dihydrolypyol 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.