

NAYARA BRAGA SARAIVA

**INTERAÇÃO CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS (*Mahanarva spectabilis*)
e CAPIM-ELEFANTE: ANÁLISE PROTEÔMICA DOS OVOS E
EFETORES EM GLÂNDULAS SALIVARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S243i
2018 Saraiva, Nayara Braga, 1984-
Interação cigarrinha-das-pastagens (*Mahanarva spectabilis*)
e capim-elefante : análise proteômica dos ovos e efetores em
glândulas salivares / Nayara Braga Saraiva. – Viçosa, MG, 2018.
viii,58f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cigarrinha-das-pastagens. 2. *Mahanarva spectabilis*.
3. Ovos - Análise. 4. Proteômica. 5. Glândulas salivares.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

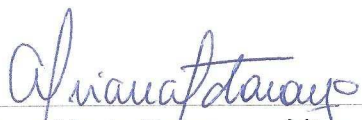
CDD 22 ed. 595.756

NAYARA BRAGA SARAIVA

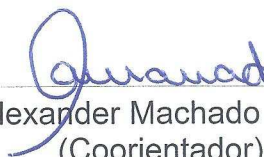
**INTERAÇÃO CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS (*Mahanarva spectabilis*) E
CAPIM-ELEFANTE: ANÁLISE PROTEÔMICA DE OVOS E EFETORES EM
GLÂNDULAS SALIVARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2018.



Adriana Maria Patarroyo Vargas



Alexander Machado Auad
(Coorientador)



Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)



Jorge Fernando Pereira



Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar presente em todos os momentos felizes e difíceis, sua presença dá sentido à vida e forças para seguir em frente.

À minha família, razão de todo o meu esforço, aos meus pais, pelo amor, dedicação, exemplo de honestidade, simplicidade, trabalho e não medirem esforços para realização dos meus sonhos.

Aos meus familiares, tios, tias e primos por sempre me apoiarem e entenderem minha ausência em momentos importantes.

A Universidade Federal de Viçosa, pela instituição exemplo de pesquisa e ensino, e pela oportunidade de realizar esse grande projeto profissional.

As agências que fomentam a pesquisa e o desenvolvimento da ciência brasileira, a CAPES pelo apoio financeiro, ao CNPq e à Fapemig pelo financiamento de projetos.

A professora Maria G. A. Oliveira pela orientação e confiança no meu trabalho.

Ao professor Humberto J. O. Ramos, pelos ensinamentos, exemplo, competência, dedicação e amor à ciência.

A Embrapa Gado de Leite e ao pesquisador Alexandre Machado Auad pela dedicação e contribuição científica.

A toda equipe do Núcleo de Análises de Biomoléculas, pela paciência e grandiosa ajuda nas análises e softwares, meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e aceitação do convite;

Ao Departamento de Bioquímica Aplicada, professores, funcionários e amigos pelo aprendizado e pelo conhecimento adquirido.

Aos amigos de laboratório, pela excelente convivência e companheirismo. Pela oportunidade de troca de conhecimento e aprendizado.

Aos meus queridos amigos, levo vocês do lado esquerdo do peito e estão comigo nesse momento.

Obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa etapa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO I	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	14
Criação de <i>M. spectabilis</i> e coleta dos ovos	14
Preparo das amostras e SDS-PAGE.....	14
Digestão tríplica e preparação de amostras para análises por LC-MS	14
Identificação de proteínas por espectrometria de massas	15
Anotações funcionais e análise de ontologia	16
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	21
AGRADECIMENTOS	22
REFERÊNCIAS	23
MATERIAL SUPLEMENTAR	26
CAPÍTULO II	31
ABSTRACT	32
ABSTRACT GRAPHIC	33
INTRODUCTION	34
MATERIALS AND METHODS	35
Plants and Insects	35
Preparation of the gland homogenates and Enzymatic Assays.....	35
Zymogram of the NTPDase activity.....	36
Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting.....	36
Immunolocalization of the NTPDase in the Salivary Glands of <i>M. spectabilis</i>	37
Hormone Analysis	37

Metabolic profiles of the salivary glands of <i>M. spectabilis</i>	38
RESULTS	39
NTPDase activity from the salivary gland	39
Identification and localization of Apyrase in salivary gland of <i>M. spectabilis</i>	39
Phytohormones responsive to the infestation by <i>M. spectabilis</i>	40
Metabolic profile of the salivary gland.....	40
DISCUSSION	41
CONCLUDING REMARKS	44
ACKNOWLEDGMENTS	44
FIGURES	45
REFERENCES	53
SUPPLEMENTARY MATERIAL	58

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Análise proteômica de ovos diapausa, não -diapausa e pós-diapausa de *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae)

Figura 1: SDS-PAGE de proteínas não fracionadas de ovos em, diapausa (S2D) não-diapausa (NDS2 e NDS4), pós-diapausa (PDS4).....	16
Figura 2: Agrupamento das proteínas identificadas em ovos Diapausa (DS2), Não-diapausa (NDS2, NDS4) e pós-diapausa (PS4) de <i>Mahanarva spectabilis</i>	17
Figura 3: Categorização funcional das proteínas identificadas em ovos Dapausicos, Não-diapausicos e Pós-diapausa de <i>Mahanarva spectabilis</i>	18
Figura 4: Rede de possíveis interações proteína-proteína em ovos de <i>Mahanarva spectabilis</i> . Os mapas de interação foram gerados pelo software SRTING 10.0..	20

CAPÍTULO II

Effectors of the salivary gland of *Mahanarva spectabilis* modulating the response to infestation of elephant grass

Figure 1: NTPDase activity of the homogenate of, males females and nymph of <i>M. spectabilis</i>	45
Figure 2: Zymogram result of the ADPase activities from homogenate salivary glands of nymph, females and males of <i>M. spectabilis</i>	46
Figure 3: Identification of NTPDases isoforms from salivary gland of <i>M. Spectabilis</i> by werternblotinnng.....	46
Figure 4: Immunofluorescence localization Apyrase within secretory cells of females of <i>M. pectabilis</i>	47
Figure 5: Clustering analysis by <i>PCA</i> (<i>principal component analysis</i>) method of the phytohormones quantified of the elephant grass leaves in different times of injury by <i>M. spectabilis</i>	48
Figure 6: Phytohormones quantified by LC/MS from the elephant grass leaves injured by <i>M. spectabilis</i>	49

Figure 7: Phytohormones quantified by LC/MS from the elephant grass leaves injured by mechanical damages.	50
Figure 8: Pathway analysis performed by MetaboAnalyst platform of the identify metabolites by GC/MS from the salivary glands of <i>M. spectabilis</i>	51

RESUMO

SARAIVA, Nayara Braga, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Interação Cigarrinha-das-Pastagens (*Mahanarva spectabilis*) e Capim-Elefante: análise proteômica dos ovos e efetores em glândulas salivares.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Alexander Machado Auad, Humberto Josué de Oliveira Ramos, Edvaldo Barros e Gláucia Cordeiro.

A cigarrinha-das-pastagens, *Mahanarva spectabilis* (Distant,1909) é a principal praga em forrageiras na América Tropical. Este inseto entra em diapausa na fase de ovo durante as estações desfavoráveis do ano. Informações sobre os processos de desenvolvimento da diapausa das cigarrinhas das pastagens e a reprogramação de defesas das plantas durante a colonização do inseto são necessárias para auxiliar no desenvolvimento de táticas de seu controle. Por meio de análises proteômicas nós identificamos e caracterizamos proteínas envolvidas em ovo de *M. spectabilis* durante a diapausa, não-diapausa e pós-diapausa. Essas estão envolvidas no processamento de informações, sinalização celular e metabolismo dos ovos deste inseto. Na segunda etapa deste trabalho foi detectado a presença de efetores nas glândulas salivares de *Mahanarva spectabilis*, tais como ácidos graxos de cadeia longa e ácido salicílico que podem estar envolvidos no processo de infestação de plantas de capim-elefante. Também foi confirmado e caracterizado a presença de apirases nas glândulas salivares das *M. spectabilis*, evidenciando que esta enzima interfere na modulação de resistência da planta. As análises fitohormonais das folhas de capim elefante indicam uma flutuação nos níveis de hormônios em função do tempo de infestação. Estes resultados nos permitem propor que efetores presentes nas glândulas salivares de cigarrinha das pastagens são responsáveis por suprimir a resposta de defesa da planta, tornando-se uma estratégia bem sucedida do inseto na colonização do hospedeiro.

ABSTRACT

SARAIVA, Nayara Braga, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Interaction Spittlebugs (*Mahanarva spectabilis*) and Elephant Grass: proteomic analysis of eggs and effectors in the salivary glands.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Alexander Machado Auad, Humberto Josué de Oliveira Ramos, Edvaldo Barros and Gláucia Cordeiro.

The spittlebugs, *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) is a major pest in forages in tropical America. This insect enters diapause in the egg phase during the unfavorable seasons of the year. Information on the processes of development of spittlebugs tasks and reprogramming of plants during livestock colonization are necessary to assist in the development of their control tactics. By means of proteomic proteins we identified and characterized the egg proteins of *M. spectabilis* during a diapause, non-diapause and post-diapause. Cells are involved in information processing, cell signaling and egg metabolism of this insect. On Monday of this year the presence of effectors in the salivary glands of *M. spectabilis*, such as long-lasting fatty acids and salicylic acid, that are involved in the infestation process of elephantgrass plants were detected. It was also confirmed and marked an apirinal presence in the salivary glands of *M. spectabilis*, evidencing that this enzyme interferes in the modulation of resistance of the plant. Phytohormonal analyzes of elephantgrass leaves are indicated for fluctuation in hormone levels as a function of time of infestation. The results in relation to the proportion that the indicators present in the spittlebugs salivary gland glands are responsible for suppressing a defense response of the plant, becoming a successful strategy in the fight against host colonization.

INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária é uma atividade de fundamental importância para a humanidade que utiliza a criação e reprodução de animais para fins econômicos e para o consumo. Sua exploração caracteriza-se pela forma extensiva ou intensiva de criação do rebanho, a qual ocupa lugar de destaque para as economias de muitos países em desenvolvimento (Upton, 2004; Souza e Sobrinho et al., 2010).

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, sendo o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne bovina, tendo as pastagens como base de alimentação do rebanho garantindo baixos custos de produção (Dias-Filho 2014; Carvalho & Zen, 2017). Em 2014, o País alimentou 212,3 milhões de bovinos, sendo que a perspectiva de crescimento neste setor é de 21,0% até 2026 (MAPA, 2016). No entanto, cerca de 50 a 70% das áreas de pastagens apresentam algum grau de degradação que decorre de diversos fatores, como o manejo inadequado dos animais, a lotações excessivas ocasionando redução dos níveis de nutrientes e fertilidade do solo, que provoca a perda de vigor e produtividade da pastagem (Dias-Filho, 2014), ou seja, sem possibilidade de recuperação natural e incapaz de sustentar os níveis de produção e qualidade exigidas pelos animais (Dutra, 2009). Outro fator que afeta a produtividade das pastagens é a ocorrência de insetos praga, como as cigarrinhas-das-pastagens (Valério, 2009).

As cigarrinhas correspondem um complexo de espécies que estão distribuídas pela América tropical, desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (Holmann and Peck 2002; Peck 2002). A espécie *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) atacam os principais gêneros de forragens (Poaceae), como *Brachiaria*, *Cynodon*, *Panicum* e *Pennisetum*, e são considerados praga limitante, sendo que muitos genótipos de forrageiras são suscetíveis a esse inseto-praga (Auaud et al., 2010; Fonseca et al., 2016).

O pico populacional das cigarrinhas em regiões tropicais, geralmente, ocorre em fevereiro-março, sendo que os ovos colocados em abril (baixa pluviosidade) entram em quiescência até as primeiras chuvas de outubro (Gallo et al., 2002). O aumento da temperatura do solo também é um indicativo do aparecimento das primeiras ninfas, que eclodem formando adultos em novembro, podendo ocorrer três gerações até fevereiro-março (Gallo et al., 2002).

Os fatores climáticos como temperatura, chuva, alta umidade e fotoperíodo durante as estações de primavera e verão nas regiões tropicais influenciam a duração do ciclo de vida, o número de picos populacionais e, conseqüentemente, o número de gerações de cigarrinhas por ano (Mendonca, 1996). O ciclo completo da embriogênese ocorre por volta de 15 dias em

ovos não-diapausos, favorecido pelo clima quente e úmido, por outro lado, nos ovos em diapausa essa duração pode se estender por até 200 dias, relacionado com meses de baixa pluviosidade e temperaturas, onde os ovos se encontram estagnados no estágio 2 da embriogenese (Auad *et al.*, 2009).

Os ovos de cigarrinha-das-pastagens são depositados em solo e em restos culturais (Valério 2009). Estudos envolvendo aspectos biológicos dos ovos de cigarrinhas do gênero *Mahanarva*, foram realizados por Peck (2002) e Auad & Carvalho (2009), que descrevem os quatro estádios embrionários: a) Estádio 1 (SN1): Ovos recém-colocados; b) Estádio 2 (SN2): Ovos com opérculo evidente de cor negra; c) Estádio 3 (SN3): Superfície negra do opérculo exposta e mancha avermelhada na parte anterior do ovo; d) Estádio 4 (SN4): Ovos próximos à eclosão, com dois pontos avermelhados em cada lado do opérculo, correspondendo aos olhos e pontos avermelhados maiores representando pigmentos abdominais das ninfas.

A quiescência e diapausa estão entre estados inativos mais importantes para a sobrevivência dos insetos. A quiescência é caracterizada por uma resposta imediata as condições ambientais adversas e pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento, quando as condições se tornam favoráveis novamente o desenvolvimento se restabelece imediatamente (Gullan & Cranston, 2009; Košťál, 2006). A diapausa é um processo complexo, sendo desencadeada por uma programação genética que pausa, ou retarda, o desenvolvimento em resposta a estímulos ambientais (Hahn & Denlinger, 2011). Esse processo vem acompanhado de supressão metabólica e ocorre em um único estágio da ontogênese, variando de espécie para espécie (Košťál 2006).

Na diapausa de insetos a tolerância ao estresse ambiental é reforçada, permitindo a sobrevivência em ambientes sazonais que não poderiam ser tolerados e permitindo a sincronização do ciclo de vida com períodos adequados para crescimento, desenvolvimento e reprodução (Hahn & Denlinger, 2011).

O início da diapausa geralmente precede as condições adversas do ambiente e seu término, não necessariamente, ocorre com o fim das adversidades (Gullan & Cranston 2009). Os estímulos ambientais que desencadeiam a entrada em diapausa são variáveis, mas geralmente estão ligados a variações de fotoperíodo, temperatura e umidade (Tauber et al 1986). A mudança sazonal na duração dos dias pode ser um bom indicador para prever a mudança de características ambientais que causam a ocorrência de diapausa, mas a diapausa não corresponde necessariamente a uma reação imediata ao fotoperíodo, podendo ocorrer em resposta a sinais recebidos numa fase anterior (Delinger, 2009; Simões et al., 2013).

Segundo Zhang *et al.* (2011), as ações hormonais juntamente com a interação nas

vias de sinalização regulam eventos homeostáticos e de desenvolvimento durante o início e bloqueio da diapausa em inseto. Embora exista uma variedade de estudos focados nas mudanças climáticas e enzimas chave que estão relacionadas a processos de diapausa (Yamashita & Yaginuma, 1991; Lin *et al.*, 2009), neste contexto autores (Gu *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2013; Bi *et al.*, 2014) têm evidenciado que alterações protéicas podem estar envolvidas no processo de regulação da diapausa.

No entanto, a maioria dos estudos de cigarrinha-das-pastagens concentraram-se na ecologia, o que torna importante a primeira investigação de análise protéica em ovos de *M. spectabilis* para a compreensão dos ciclos de vida dos insetos, além disso, esses resultados poderão servir de subsídio nos estudos de desenvolvimento de estratégias de controle no manejo de pragas.

A variação na biologia, habitat e taxonomia de espécies de cigarrinhas compromete seriamente a eficácia de um sistema de gestão que tende a generalizar os diversos associações entre o inseto, a planta hospedeira e o habitat (Peck 2002). A infestação das cigarrinhas-nas-pastagens tem início com a chegada das chuvas, os ovos são depositados no solo que dão origem às ninfas que são ativas e resistentes, ficam sempre protegida por uma espuma branca característica e seu estágio de vida dura aproximadamente 40 dias, variando de acordo com as condições climáticas e espécie (Valério, 2009).

As ninfas são responsáveis por sugar constantemente a seiva das raízes, ocasionam desordem fisiológica em decorrência das picadas que atingem os vasos lenhosos da raiz e os deterioram dificultando ou impedindo o fluxo de água e de nutrientes (Aquad *et al.*, 2010); Porém os maiores danos são causados pelos insetos adultos que vivem em torno de 10 a 15 dias e se alimentam da parte aérea, folhas e brotações, sugando a seiva e injetando toxinas nas plantas (Resende *et al.*, 2013; Fonseca *et al.*, 2016), causando distúrbios fisiológicos, reduzindo a produção de massa seca e qualidade da forragem, tornando-as impaláveis para o gado e limitando a produtividade de pastagem (Byers & Wells, 1966; Resende *et al.*, 2013).

No entanto, as plantas não são passivas a essas injúrias e desenvolveram mecanismos de resposta contra secreções orais de herbívoros (efetores), através de sinais de reconhecimento importantes que podem ser utilizados para mediar defesas induzidas (elicitores) (Nabity *et al.*, 2013; Giron & Glevarec, 2014). Para colonizar e explorar as plantas, os herbívoros devem "derrotar" os elicitores, quanto antes a "sinalização de perigo" da planta for derrotada mais efetiva a colonização (Guiguet *et al.* 2016).

Em plantas a modulação do "sinal de perigo" pode ser oriundo por mecanismos de eATP: (1) redução/a geração de eATP, (2) diminuição da longevidade do sinal eATP gerado,

(3) intervenção no funcionamento de receptores,(4) intervenção em vias de sinalização. Um dos efetores de herbívoros que ajuda a controlar [eATP] é a enzima apirase, que desempenha um papel fundamental na modulação das respostas, sendo classificada como ATP difosfohidrolase (Clark *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2014). As ATP difosfohidrolase (apirase, ATPDase, ATPase, NTPDase, EC 3.6.1.5) compõem uma família de enzimas; existem três famílias de apirases: a célula CD39 apirase (Knowles, 2011) e as apirases do tipo Cimex (Valenzuela *et al.*, 1996), ambas as quais são ectonucleosídeos trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) e as ecto-50-nucleotidases. Estas enzimas atuam na hidrólise de nucleotídeos di e tris-fosforilados, como ADP e ATP, sendo ativadas por íons bivalentes como cálcio e magnésio (Zimmermann, 2001).

Guiguet *et al.* (2016) evidenciou que durante a colonização de plantas os herbívoros injetam apirases presentes em sua saliva interferindo nos "sinais de perigo precoce", que inicia com aumento de eATP gerado no local de feridas da planta e ativando mensageiros secundários que ativam as respostas específicas de defesa da planta. Desta forma a sinalização dos fitohormônios de defesa é bloqueada (Guiguet *et al.* 2016) pelo suprimento da expressão de genes defensivos regulados pelas vias jasmonato (JA) e etileno (ET) (Song *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012), tornando-se uma estratégia de sucesso utilizada pelos herbívoros na colonização e exploração de plantas (Lim *et al.*, 2014).

Estudo de efetores utilizados por herbívoros na colonização de plantas ainda são recentes (Acevado *et al.*, 2015; Giron *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Assim, o objetivo desse trabalho foi evidenciar o papel da apirase presente em glândula salivar de *Mahanarva spectabilis* envolvida na modulação hormonal de plantas durante a colonização, além disso, foi indentificado as proteínas espessas nos ovos desta praga. No capítulo I, os experimentos foram direcionados para a identificação de proteínas presentes em ovos diapáusicos, não-diapausicos e pós-diapausa. No capítulo II, realizamos análise investigativa da presença de apirase em glândula salivar de *Mahanarva spectabilis* e sua ação na modulação hormonal de plantas.

REFERÊNCIAS

- Acevado, F.E., Rivera-Vega, L.J., Chung, S.H., Ray, S., Felton, G.W. Cues from chewing insects – the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26,p. 80–86, 2015.
- Andrade, W.R., Silva, M.F., Porto, E.M.V., Vitor, C.M.T.; Pinto, F.S. Densidade Populacional de Perfilhos de Cultivares de *Brachiaria Brizantha* Submetidas a Doses Crescentes de Nitrogênio. 5º Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG), Universidade Estadual de Montes Claros, 2011.
- Auad, A. M., Carvalho, C. A. Desenvolvimento e viabilidade de ovos de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) submetidos a diferentes regimes de hidratação. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 76, n. 4, p. 711-714, out/dez. 2009.
- Auad, A.M., Domingues, R., Machado MA, Souza LS, Carvalho GS, Paula-Moraes SV. Genetic variability of *Mahanarva* sp. (Hemiptera: Cercopidae) collected from different sites in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 9: 1005–1010, 2010.
- Byers, R.A., Wells, H.D. Phytotoxemia of *Coastal bermudagrass* caused by the two-lined spittlebug *Prosapia bicincta* (Homoptera: Cercopidae). *Annals of the Entomological Society of America*, Columbus, v 59, p. 1067-1071, 1966.
- Carvalho, T.B., Zen, S. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências. *Revista iPecege*, v 3, p. 85-99, 2017.
- Clark, G., Morgan, R.O., Fernandez, M.-P., Salmi, M.L., Roux, S.J. Breakthroughs spotlighting roles for extracellular nucleotides and apyrases in stress responses and growth and development. *Plant Sci.* 225, p. 107–116, 2014.
- Delinger, D. L. Diapause. 267-270 In.: Resh, V. H., & Cardé, R. T. (Eds.). 2009. *Encyclopedia of Insects*. Academic Press. Burlington.
- Dias-Filho, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Belém: EMBRAPA/CPATU, 2014.
- Dutra, J.E. Recuperação de Pastagem Degradada com Tratamentos Físicos-Mecânicos Associados aos Tratamentos Químicos. *Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente*. Vol. XII, Nº14 p.371-383 - Ano 2009.
- Fonseca, M.G., Auad, A.M., Resende, T.T., Hott M.C., Borges C.A.V. How will *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) respond to global warming. *J, Pest Sci.* v 16,p.1–6, 2016.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R. P. L. C., Baptista, G. C., Filho, E. B., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B., Vendramim, J. D., Marchini, L. C., Lopes, J. R. S., Omoto, C. Manual de entomologia agrícola. 3.ed. Piracicaba:FEALQ, p. 920, 2002.

Giron, D., Glevarec, G. Cytokinin-induced phenotypes in plant–insect interactions: learning from the bacterial world. *J. Chem. Ecol.* v 40,p. 826–835, 2014.

Giron, D., Huguet, E., Stone, G.N., Body, M., 2016. Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant. *J. Insect Physiol.* v 84,p. 70–89, 2016.

Guagliumi, P. Pragas da cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. Coleção Canavieira, n. 10, 1972.

Gullan, P. J., Cranston, P. S. The insects: an outline of entomology. John Wiley & Sons. 565 p. 2009.

Guiguet, A., Dubreuil G., Harris M. O., Appel H.M., Schultz J.C., Pereira M.H. Shared weapons of blood- and plant-feeding insects: surprising commonalities for manipulating hosts. *J. Insect Physiol.* v 84, p.4-21, 2016.

Gu, S. H., Young, S. C., Tsai, w. C., Lin, J. L., Lin, P. L. Involvement of 4E-BP phosphorylation in embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology.* v 57, p. 978-985, 2011.

Hahn, D., Denlinger, D.L. Energetics of insect diapause. *Annu. Rev. Entomol.* v 56, p. 103–121, 2011.

Hahn, D., Denlinger, D.L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *J. Insect Physiol.* v 53, p. 760–773, 2007.

Holmann, F., Peck, D. C. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. *Neotropical Entomology, Londrina,* v 31, n. 2, p. 275-284, 2002.

Koštál, V. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology,* 52: 113-127, 2006.

Koštál, V., Štětina, T., Poupardin, R., Korbelová, J., Bruce, A. W. Conceptual framework of the ecophysiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A,* v.108, p.41, 2011.

Lim, M.H., Wu, J., Yao, J., Gallardo, I.F., Dugger, J.W., Webb, L.J., Huang, J., Salmi, M.L., Song, J., Clark, G., et al., 2014. Apyrase suppression raises extracellular ATP levels and

induces gene expression and cell wall changes characteristic of stress responses. *Plant Physiol.* v 164, p. 2054–2067, 2014.

Nabity, P.D., Haus, M.J., Berenbaum, M.R., DeLucia, E.H. Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, p. 16663–16668, 2013.

Peck, C. Distribución y reconocimiento del salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en la Costa Caribe de Colombia. *Pasturas Tropicales*, v. 24, n. 1, p. 4-15, 2002.

Resende, T.T., Auad, A.M., Fonseca, M.G., Sobrinho, F.S., Santos, D.R., Silva, S.E.B. The Damage Capacity of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) Adults on *Brachiaria ruziziensis* Pasture. *Scientific World Journal*, 2013.

Simões, A.D., Lima, E.R., Auad, A.M., Resende, T.T., Leite, M.V. Development of the Spittlebug *Mahanarva fimbriolata* under Varying Photophase Conditions. *Journal of Insect Science*, 13, 105, 2013.

Song, C.J., Steinebrunner, I., Wang, X., Stout, S.C., Roux, S.J.. Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* v140, p.1222–1232, 2006.

Tauber, M.J., Tauber, C.A., Masaki, S. Seasonal adaptations of insect. N.Y., Oxford University Press, 411p. 1986.

Valério, J. R. Cigarrinha das pastagens. Rio de Janeiro: EMBRAPA Gado de corte, 2009.

Valenzuela, J. G., Charlab, R., Galperin, M. Y., Ribeiro, J.M. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *J Biol Chem* v 273, p.30583–30590, 1996.

Wu S., Peiffer M., Luthe D.S., Felton G.W. ATP hydrolyzing salivary enzymes of caterpillars suppress plant defenses. *PLoS ONE* 7, e41947, 2012.

Xu, W.H., Sato, Y., Ikeda, M., Yamashita, O. Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori* and its distribution in some insects. *Biochimica et Biophysica Acta* v 1261, p. 83–89, 1995.

Zhang, X., Jiang, S., Mitok, K.A., Li L., Attie, A.D., Martin, T.F.J. BAIAP3, a C2 domain-containing Munc13 protein, controls the fate of dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* 2017.

Zhang M, Zheng XL, Song SQ, Zeng QW, Hou L, Li DM, Zhao J, Wei Y, Li XB, Luo M. Spatiotemporal manipulation of auxin biosynthesis in cotton ovule epidermal cells enhances fiber yield and quality. *Nat Biotechnol.* v 29, p. 453–458, 2011.

Zimmermann, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* v 52,p. 44–56, 2001.

Zhou G, Miesfeld R. L. Energy metabolism during diapause in *Culex pipiens* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* v 55,p. 40–46, 2009.

Zhao, C., Shukle, R., Navarro Escalante, L., Chen, M., Richards, S., Stuart, J.J. Avirulence gene mapping in the hessian fly (*Mayetiola destructor*) reveals a protein phosphatase 2C effector gene family. *J. Insect Physiol.* v 84, p. 22–31, 2016.

CAPÍTULO I

Análise proteômica de ovos diapausa, não-diapausa e pós-diapausa de *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae)

Nayara Braga Saraiva, Alexander Machado Auad, Flaviane Silva Coutinho, Edvaldo Barros, Humberto Josué de Oliveira Ramos, Maria Goreti de Almeida Oliveira. Análise proteômica de ovos diapausa e não-diapausa de *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). Manuscrito em preparação.

Análise proteômica de ovos diapausa, não-diapausa e pós-diapausa de *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae)

Nayara B. Saraiva¹, Alexander Machado Auad², Flaviane Silva Coutinho¹Edvaldo Barros³, Humberto J. O. Ramos^{1,3}, Maria G. A. Oliveira¹

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, BIOAGRO/INCT-IPP, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.

² Laboratório de Entomologia, Corporação Brasileira de Pesquisa Agrícola, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

³ Centro de Análise de Biomoléculas, NuBioMol, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

Autor correspondente: Nayara B. Saraiva

E-mail: nayara.braga@hotmail.com

RESUMO

Muitos insetos entram em diapausa como alternativa de sobrevivência em períodos desfavoráveis. A cigarrinha das pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) acometem os principais gêneros de forrageiras e garantem a sobrevivência dos seus descendentes por meio da diapausa facultativa. No entanto, a diapausa envolve processos de geração, manutenção e ruptura que ainda não foram completamente elucidados. Neste trabalho realizamos a identificação e caracterizar as proteínas de ovos em diapáusa (D), não-diapausa (ND) e pós-diapausa (PD) de *Mahanarva spectabilis* utilizando abordagem *shotgun* LC-MS/MS combinada com análises de bioinformática. Um total de 87 proteínas, sendo 20 diapausa, 19 não-diapausa e 22 pós-diapausa foram identificadas. O agrupamento das proteínas identificadas revelou maior número de proteínas envolvidas com processos de informação (55%) em ovos diapáusicos, no entanto, os ovos não-diapáusicos e pós-diapausa apresentaram maior número de proteínas relacionadas ao processo celular e sinalização (42%; 50%) e com metabolismo (15%; 35%) respectivamente. Com base nas suas funções moleculares, os resultados de agrupamento funcional e GO obtidos revelaram que o grupo de proteínas predominantes estão a relacionadas com atividade molecular e constituintes ribossomais em ovos não-diapausa e sinalização celular e proteínas de choque térmico (Hsps) em ovos diapausa e mecanismos de fosforilação e transporte de prótons em ovos pós-diapausa. Nós concluímos que o desenvolvimento e os caminhos fisiológicos entre a diapausa,

não-diapausa e pós-diapausa de ovos de *M. spectabilis* estão relacionadas com a auto-proteção dos ovos durante a diapausa e com desenvolvimento da embriogênese nos ovos não-diapáusicos, favorecendo a sobrevivência da espécie e de futuras gerações no campo. Este é o primeiro estudo sobre a análise proteômica de ovos diapausa, não-diapausa e pós-diapausa em *M. spectabilis* e acreditamos que nossas descobertas serão úteis no desenvolvimento de estratégias para o controle desta praga.

Palavras-chave: Diapausa, *Mahanarva spectabilis*, Proteômica

ABSTRACT

Many insects enter into diapause as an alternative for survival in unfavorable periods. The grasshopper of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) pastures affects the main genera of forages and guarantees the survival of their offspring through facultative diapause. However, diapause involves processes of generation, maintenance and rupture that have not yet been fully elucidated. In this work we performed the identification and characterization of *M. spectabilis* diapause (D), non-diapause (ND) and post-diapause (PD) eggs proteins using LC-MS / MS shotgun approach combined with bioinformatics analyzes. A total of 87 proteins, 20 diapause, 19 non-diapause and 22 post-diapause were identified. However, non-diapause and post-diapause eggs presented higher number of proteins involved in the cellular process and signaling (42%; 50%) and with metabolism (15%, 35%) respectively. Based on their molecular functions, the functional grouping and GO results revealed that the predominant proteins group is related to molecular activity and ribosomal constituents in non-diapause eggs and cell signaling and heat shock proteins (Hsps) in diapause eggs and mechanisms of phosphorylation and proton transport in post-diapause eggs. We conclude that the development and physiological pathways between diapause, non-diapause and post-diapause of *M. spectabilis* eggs are related to the self-protection of eggs during diapause and to the development of embryogenesis in non-diabetic eggs, favoring the survival of the species and future generations in the field. This is the first study on the proteomic analysis of diapause, non-diapause and post-diapause eggs in *M. spectabilis* and we believe that our findings will be useful in developing strategies to control this pest.

Key words: Diapausa, *Mahanarva spectabilis*, Proteomics

INTRODUÇÃO

A pecuária tem fundamental importância para a humanidade, pois utiliza a criação e reprodução de animais para fins econômicos e de consumo. Sua exploração caracteriza-se pela forma extensiva ou intensiva de criação do rebanho, a qual ocupa lugar de destaque para as economias de muitos países em desenvolvimento (Upton, 2004; Souza & Sobrinho, 2010).

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, tendo as pastagens como base da alimentação do gado, garantindo baixos custos de produção (Dias-Filho 2014; Carvalho & Zen, 2017). No entanto cerca de 50 a 70% das áreas de pastagens apresentam algum grau de degradação e pouca possibilidade de recuperação natural, sendo incapazes de sustentar os níveis de produção e qualidade exigidas pelos animais (Dias-Filho, 2014). Outro fator que afeta a produtividade das pastagens é a ocorrência de insetos praga, como as cigarrinhas-das-pastagens (Valério, 2009).

As cigarrinhas *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) acometem os principais gêneros de forragens, sendo considerada inseto-praga limitante na América Tropical (Holmann & Peck 2002; Auad *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2016).

Os ovos de cigarrinha das pastagens são depositados em solo e em restos culturais (Valério, 1999). Estudos envolvendo aspectos biológicos dos ovos de cigarrinhas do gênero *Mahanarva* foram realizados Peck (2002) e Auad & Carvalho (2009), que descrevem os quatro estádios embrionários: Estádio 1 (SN1): Ovos recém-colocados; Estádio 2 (SN2): Ovos com opérculo evidente de cor negra; Estádio 3 (SN3): Superfície negra do opérculo exposta e mancha avermelhada na parte anterior do ovo; Estádio 4 (SN4): Ovos próximos à eclosão, com dois pontos avermelhados em cada lado do opérculo, correspondendo aos olhos e pontos avermelhados maiores representando pigmentos abdominais das ninfas.

O ciclo completo da embriogênese ocorre por volta de 15 dias em ovos não-diapausos, favorecido pelo clima quente e úmido, por outro lado, nos ovos em diapausa essa duração pode se estender por até 200 dias, relacionado com meses de baixa pluviosidade e temperaturas, onde os ovos se encontram estagnados no estágio 2 da embriogênese (Auad *et al.*, 2009; Košťál *et al.*, 2017). Os fatores climáticos como temperatura, chuva, alta umidade e fotoperíodo durante as estações de primavera e verão nas regiões tropicais influenciam a duração do ciclo de vida destes insetos praga, assim como o número de picos populacionais e, conseqüentemente, o número de gerações de cigarrinhas por ano (Mendonça, 1996).

Os estímulos ambientais que desencadeiam a entrada em diapausa são variáveis, mas geralmente estão ligados a variações de fotoperíodo, temperatura e umidade (Tauber *et al.*

1986). Assim, o início da diapausa geralmente precede as condições adversas do ambiente e seu término, não necessariamente, ocorre com o fim das adversidades (Gullan & Cranston 2009). A mudança sazonal na duração dos dias pode ser um bom indicador para prever a mudança de características ambientais que causam a ocorrência de diapausa, mas a diapausa não corresponde necessariamente a uma reação imediata ao fotoperíodo, podendo ocorrer em resposta a sinais recebidos numa fase anterior (Delinger, 2009; Simões et al., 2013).

A diapausa é considerada uma via dinâmica induzida por pistas ambientais específicas que envolve várias fases, contribuindo para a sobrevivência dos insetos em condições desfavoráveis, como baixa temperatura, seca ou falta de alimentos (Denlinger, 2002; Košťál *et al.*, 2017). Nesse estágio a atividade metabólica transitória, garantindo várias necessidades ligadas aos preparativos para o período longo de inatividade comportamental e supressão metabólica (Košťál, 2006). Assim, os insetos continuam respondendo e induzindo estímulos que os ajudam na manutenção da diapausa, com tolerância ao estresse ambiental reforçada, permitindo a sincronização do ciclo de vida com períodos adequados para crescimento, desenvolvimento e reprodução, porém, para conseguir esse empreendimento os insetos necessitam gerenciar suas reservas de energia (Hahn & Denlinger, 2011).

As reservas extras permanecem com o inseto após o término da diapausa, e servem como aditivo para o desenvolvimento e reprodução, aumentando o desempenho metabólico pós-diapausa (Zhou & Miesfeld, 2009). Além disso, são utilizadas na manutenção celular de ambos os grupos, promovendo a produção de energia catabólica e processos anabolizantes, incluindo rotação de proteínas e manutenção da remodelação da membrana celular (Kostal, 2006). Deste modo, os insetos em diapausa não apresentam metabolismo mais lento do que outros insetos comuns na mesma fase de vida; eles encontraram um caminho alternativo de desenvolvimento que demanda outros empreendimentos metabólicos.

O conhecimento da diapausa é essencial para a compreensão dos ciclos de vida dos insetos e para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle de pragas (Denlinger *et al.*, 2012). No entanto, a diapausa envolve processos de geração, manutenção e ruptura, que ainda não foram completamente elucidados (Chen *et al.*, 2014). Neste trabalho, propomos identificar e caracterizar as proteínas expressas de ovos em diapáusa (D), não-diapausa (ND) e pós-diapausa (PD) de *M. spectabilis* utilizando abordagem *shotgun* LC-MS/MS combinada com análises de bioinformática.

Este é o primeiro estudo sobre a análise proteômica de ovos de *M. spectabilis* e acreditamos que nossas descobertas serão úteis no desenvolvimento de estratégias para controle desta praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação de *M. spectabilis* e coleta dos ovos

Adultos de *M. spectabilis* foram coletados na estação experimental do Programa de Criação de Forragens da Embrapa Gado de Leite, Brasil, e transportados para Laboratório de Entomologia. Os insetos foram mantidos em gaiolas cilíndricas de acrílico (30 × 30 × 60 cm), forradas com gaze umedecida com água destilada que servia como substrato para ovoposição dos insetos.

Para remover os ovos depositados no substrato, a gaze foi colocada sobre um conjunto de peneiras e submetida a jatos de água, de modo que os ovos permanecessem na peneira (400 µm). Os ovos foram colocados em placas de Petri (10 cm de diâmetro), que foram revestidas com papel de filtro e incubadas em uma câmara climática (28 ± 2 ° C, 70 ± 10% umidade relativa, fotofase de 14 h). O papel de filtro foi umedecido diariamente com água destilada e o desenvolvimento embrionário foi observado até os estágios diapausa (D) (S2D), não-diapáusa (ND) (S2N e S4N), pós-diapausa (PD) (S4N), período de aproximadamente 200 dias, para utilização nos bioensaios.

Preparo das amostras e SDS-PAGE

As amostras de 120 ovos diapáusicos e não diapáusicos foram mecanicamente homogeneizados em 50 µl de tampão SDS 4% e submetidas a cinco ciclos em banho de nitrogênio líquido por 5s, vortexadas (Tissuelyser II – QIAGEN®) por 2 min/30rpm e sonicadas por 30s com 30s de intervalo, em banho de gelo. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação 13.000g a 4°C por 10min e submetido à quantificação protéica pelo método de Bradford (1976).

Um total de 50µg de proteína foi analisada em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli *et al.* (1970). A corrida foi realizada a 70 V, deixando a amostra percorrer por 2 cm no gel. Os géis foram corados com solução de azul de *Coomassie* G-250 e digitalizados usando *ImageScanner* III (GE Healthcare).

Digestão trípica e preparação de amostras para análises por LC-MS

As bandas de proteínas foram excisadas manualmente do gel e submetidas à digestão

com tripsina em gel segundo Shevchenko *et al.* (2007). Os fragmentos de gel foram descorados através de sucessivas lavagens em solução 50 mM bicarbonato de amônio/50% de metanol (v/v), seguido de acetonitrila para desidratação. As proteínas foram reduzidas em solução de DTT 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56°C utilizando banho seco. Em seguida, alquiladas em solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Os pedaços de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min, desidratados em acetonitrila por 5 min e secos em *speed vac* por 15 min.

Para a digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (Trypsin, from porcine pancreas, Proteomics grade - Sigma) 20 ng/mL em solução de bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 e acetonitrila 10%, incubadas a 37°C por 16h. Os peptídeos digeridos foram extraídos utilizando tampão de extração com acetato de etilo 50% (v / v), ácido fórmico a 5% (v/v), seco por centrifugação a vácuo e ressuspenso em ácido fórmico a 0,1% (v/v).

Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para a identificação das proteínas 10 µL da amostra de ovos diapáusicos, não-diapáusicos e pós-diapausa foram aplicados em sistema LC-MS, usando um nanoUPLC (nanoACQUITY-Waters) contendo uma coluna capilar C18 BEH130 1.7 µm -100 nm × 100 mm, operando com uma taxa de fluxo de 0,5 µL/min. Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em espectrômetro de massas do tipo Q-Tof (Bruker Daltonics), atuando no modo *online*, usando uma agulha de ionização nanoESI. O escaneamento dos íons realizado pelo espectrômetro massas foi entre 300 e 1500 m/z em modo positivo e os dados foram adquiridos durante 70 min em cada análise LC-MS/MS. O espectrômetro de massas operou no modo auto-MSn. A aquisição dos dados do instrumento LC-MS foi gerida pelo *software Hystar* (Bruker) e os espectros foram processados pelo *software Data Analysis* (Bruker) utilizando as configurações padrões para proteômica.

Os espectros foram analisados pelo programa PEAKS 7 com uma licença de Client local, conectado com um servidor remoto, para identificação de proteínas. Os parâmetros utilizados no programa foram: lista de proteínas obtida de *Insecta*, contendo todas as proteínas descritas no banco de dados, oxidação da metionina como modificação variável, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, uma clivagem perdida, estados de cargas de 2+, 3+, 4+, tripsina como enzima de clivagem e erro de massa de 0.15Da. Foram

consideradas como positivos verdadeiros, identificações com FDR menor que 5,0%.

Anotações funcionais e análise de ontologia

As proteínas identificadas foram submetidos à pesquisa de homologia usando BLASTX contra a base de dados de proteínas Phytozome, os números GI foram extraídos e enviados para a ferramenta de mapeamento UniprotRetrieved/ ID para gerar a caracterização funcional (GO). Os genes foram identificados utilizando anotações de *Drosophila* depositados no banco de dados de Grupos Ortólogos (KOG). As redes de interação proteína-proteína entre as proteínas identificadas no estudo e entre elas e outras proteínas não identificadas aqui, foram preditas pelo *software* String 10.0 (disponível online: <http://stringdb.org/>). Os números de acesso para cada proteína gerada pelo UniProt foram carregados no *software*, que foi configurado para pesquisar o banco de dados de *Drosophila*. O escore de interação mínimo requerido foi ajustado para 0.900 (alta confiança) e não foram permitidas mais de 20 interações.

RESULTADOS

Identificação proteíns expressas em ovos diapáusicos, não diapáusicos e pós-diapáusicos de *Mahanarva spectabilis*

Um total de 87 proteínas, sendo 20 diapausa e 41 não-diapausa e 26 pós-diapausa foram identificadas (Figura 2 e Tabela Suplementar 1) com alta confiança pelo do software PEAKS 7 (FDR menor 5%). Foram identificadas 12 proteínas comuns entre os estágios, entre elas, vitelogenina, histona H4, histona H2A, α -tubulina, α -hemoglobina e ATP sintase.

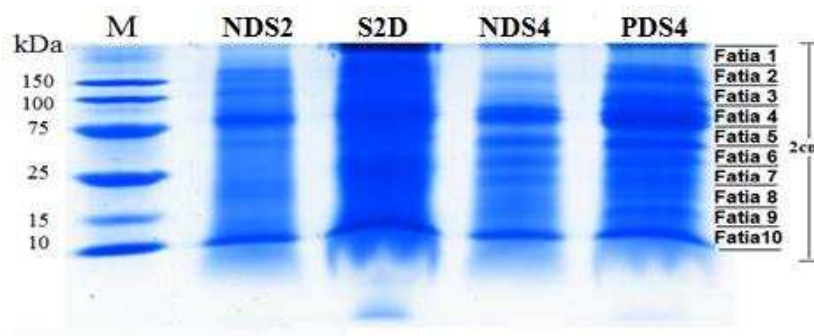


Figura 1. SDS-PAGE de proteínas não fracionadas de ovos em diapausa (S2D) não-diapausa (NDS2 e NDS4), pós-diapausa (PDS4) respectivamente. As amostras foram separadas em gel de resolução 12% até percorrem por 2 cm e fracionadas manualmente em dez fatias. (M) marcador de massa molecular.

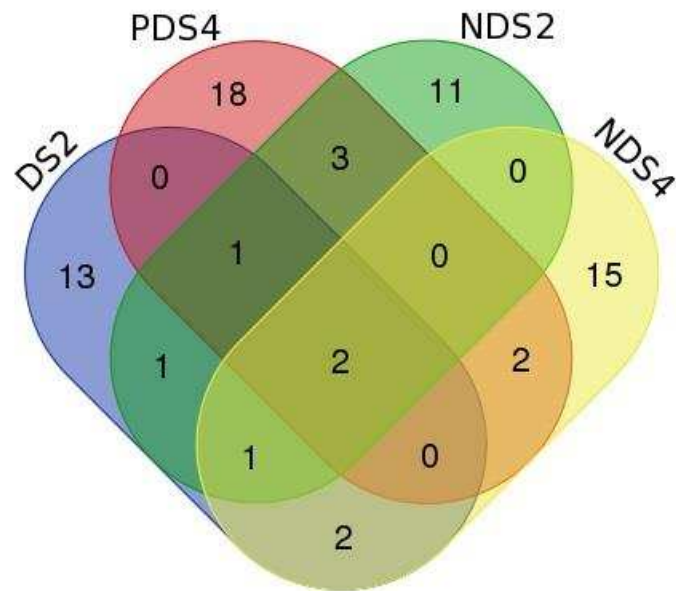
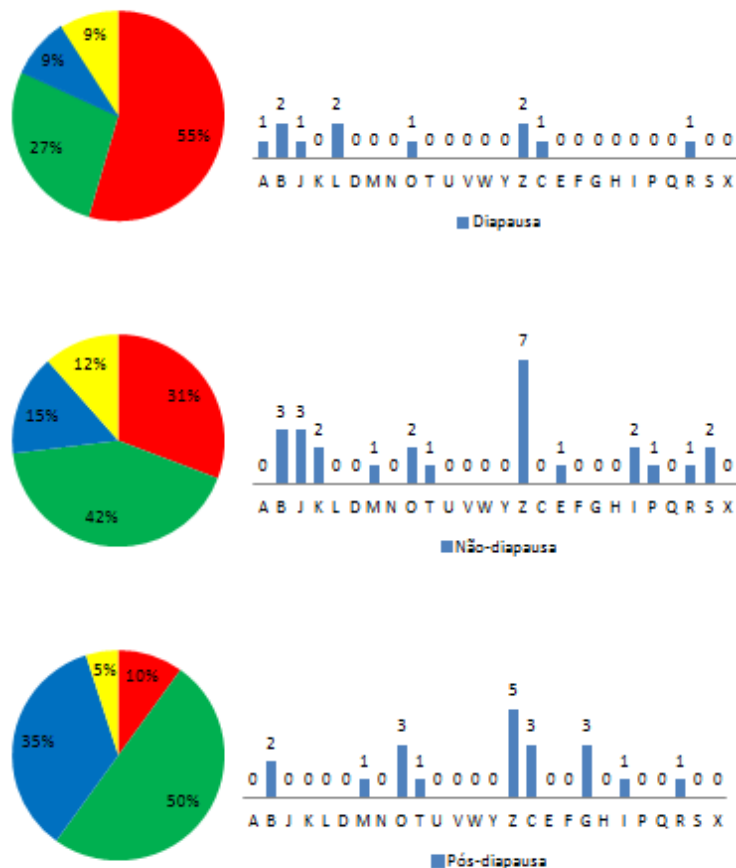


Figura 2. Agrupamento das proteínas identificadas em ovos Diapausa (DS2), Não-diapausa (NDS2, NDS4) e pós-diapausa (PS4) de *Mahanarva spectabilis*.

O agrupamento das proteínas identificadas revelou maior número de proteínas envolvidas com processos de informação (55%) em ovos diapáusicos, no entanto em ovos não-diapáusicos e pós-diapausa apresentaram maior número de proteínas relacionadas ao processo celular/sinalização (42%; 50%) e metabolismo (15%; 35%) respectivamente (Figura 3).



- PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÃO**
 - (A) Processamento e modificação de RNA
 - (B) Estrutura e dinâmica de cromatina
 - (J) Tradução, estrutura ribossomal e biogênese
 - (K) Transcrição
 - (L) Replicação, recombinação e reparo
- PROCESSAMENTO CELULAR E SINALIZAÇÃO**
 - (D) Controle do ciclo celular e divisão celular
 - (M) Parede celular/membrana/biogenesis
 - (N) Motilidade celular
 - (O) Modificação postranslacional, rotação de proteínas, chaperonas
 - (T) Mecanismos de sinalização transducional
 - (U) Movimento intracelular, secreção e transporte vesicular
 - (V) Mecanismo de defesa
 - (W) Estrutura extracelular
 - (Y) Estrutura nuclear
 - (Z) Citoesqueleto
- METABOLISMO**
 - (C) Produção de energia e conversão
 - (E) Transporte de amino ácido e metabolismo
 - (F) Transporte de nucleotídeo e metabolismo
 - (G) Transporte de carboidrato e metabolismo
 - (H) Transporte de coenzima e metabolismo
 - (I) Transporte de Lipídeos e metabolismo
 - (P) Transporte íons inorgânicos e metabolismo
 - (Q) Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo
- POUCA CARACTERIZAÇÃO**
 - (R) Apenas predição e função geral
 - (S) Função não caracterizada
 - (X) Proteína sem nome

Figura 3. Categorização funcional das proteínas identificadas em ovos Diapausicos, Não-diapausicos e Pós-diapausa de *Mahanarva spectabilis*. A) Resultado da análise de categorização funcional das proteínas identificadas em ovos Diapausa, que apresentaram assinaturas específicas nas categorias do KOG. B) Resultado da análise de categorização funcional das proteínas identificadas em ovos não-diapausa e (C) Resultado da análise de categorização funcional das proteínas identificadas em ovos pós-diapausa, que apresentaram assinaturas específicas nas categorias do KOG. No eixo x estão as categorias do KOG. No eixo y estão os números de proteínas encontradas para cada categoria do KOG.

Interação proteína-proteína e significado biológico das proteínas identificadas em ovos diapáusicos, não diapáusicos e pós-diapáusicos de *Mahanarva spectabilis*

A lista de proteínas identificadas em ovos diapausa e não-diapausa com anotações foram submetidas ao *software* String 10.0, possibilitando a visualização redes de interação protéicas e processos metabólicos (Figura 4). Nos ovos em diapausa, identificamos proteínas de ligação ao DNA (His2A, His2B, His4, Fbpp0085281, CG31613), vitelogenina (Yp1, Yp2, Yp3), proteínas de choque térmico (Hsp68, Hsp70Ab, Hsp70Bc) e proteínas relacionadas à

geração de metabolitos precursores de energia (Eno, Tpi, PyK, PgK, Pglym78, Ald, Gapdh1, Gapdh2, blw, Oscp, ATPsyn-d, CG7813, CG5389, CG7610, CG1746, I(1)G0230) que compreendem processos glicolíticos e metabolismo de ATP (Figura 4A). Entre as proteínas identificadas nos ovos não-diapausa, identificamos histonas (His2A, His2B, His4), proteínas ribossomais (RpS19a, RpS2, RpS17, RpL27A, RpL13A, RpS16, RpL14, RpL9, RpL15, RpS8, RpS28b, RpS20, RpS23, RpS9, RpS10Ab, RpL4, RpS15, RpS3, RpLP2, RpS5a) e fator de alongação (F2) que compreendem proteínas envolvidas em processos de biossíntese de macromoléculas e regulação de expressão gênica em grupos pós-diapausa (Figura 4B).

Com base nas suas funções moleculares, os resultados de GO obtidos do String revelaram que o grupo de proteínas predominante são as relacionadas com atividade molecular e constituintes ribossomais em ovos pós-diapausa e mecanismos de fosforilação e transporte de prótons em ovos diapausa (Figuras 4C).

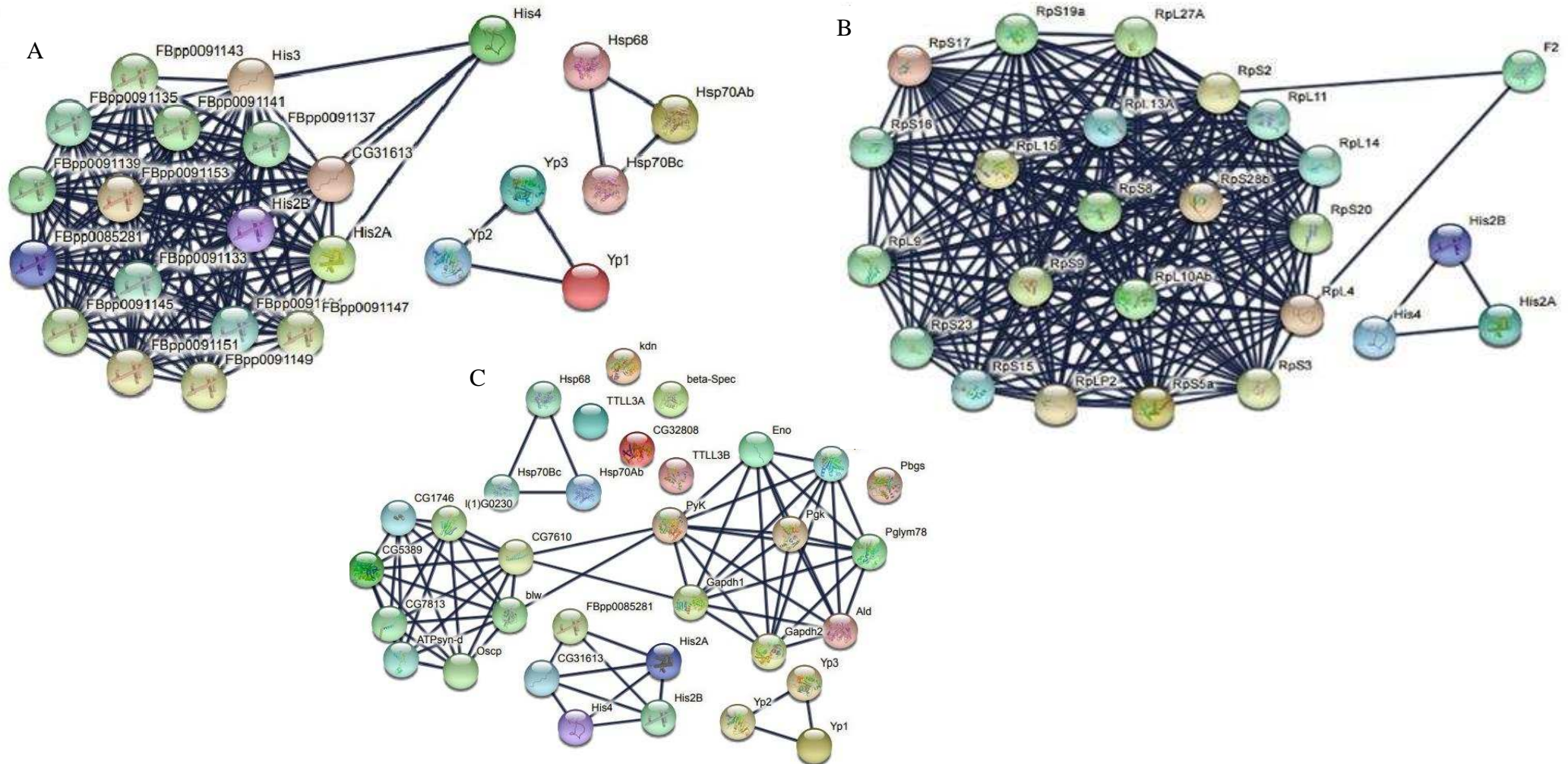


Figura 4. Rede de possíveis interações proteína-proteína em ovos de *Mahanarva spectabilis*. Os mapas de interação foram gerados pelo software SRTING 10.0. A) Proteína em ovos diapausicos: H3A (His3A), Histona H4 (His4) Histona H2A, Histona H2B (His2), Vitelogenina (Yp1,Yp2,Yp3), Proteínas de choque térmico (Hsp70Ab, Hsp68, Hsp70Bc), e proteínas de ligação a DNA (FBpps), (CG31613). B) Proteínas de ovos não-diapaúsicos: *Fator de elongação 1-alpha* (F2), Proteínas ribossomais (RpSs e RplS), Histona H4 (His4) Histona H2A, Histona H2B (His2).C)Proteínas dos ovos pós-diapaúsicos : Histona H4 (His4) Histona H2A, Histona H2B (FBpp0085281), DNA binding (CG31613), Proteínas de choque térmico Proteínas (Hsp70, Hsp68, Hsp70Bc), Enolase (Eno), Triose fosfato isomerase (Tpi), Piruvato cinase (PyK), Fosfoglicerato cinase (PgK), Fosfogliceromutase(Pglym78), Aldolase (Ald), Gliceraldeido-3P deidrogenase 1 (Gapdh1), Gliceraldeido-3P deidrogenase 2 (Gapdh2), Bellwether-ATP sintase (blw), Proteína que confere sensibilidade à oligomicina (Oscp), ATP sintase (ATPsyn-d), ATPase exportadora de hidrogénio (CG7813), ATPase exportadora de hidrogénio (CG1746), Lethal (I(1)G0230), Vitelogenina (Yp1,Yp2,Yp3).

DISCUSSÃO

A cigarrinha-das-pastagens *M. spectabilis*, é uma praga economicamente importante para as forrageiras. A falta de informações relacionada à diapausa é uma barreira para compreender as estratégias evolucionárias desta espécie e novas alternativas de controle. A estratégia de shotgun, baseada em digestão proteolítica de misturas de proteínas complexas, por separação LC de peptídeos e seqüenciamento de MS em tandem, tem sido amplamente utilizada (Fan *et al.*, 2013).

Neste estudo nos identificamos proteínas expressas em ovos diapausa, não-diapausa e pós-diapáusicos de *M. spectabilis*, relatando a presença de proteínas comuns entre os diferentes estádios como tubulina, albumina, vitelogenina, histonas e ATP sintase, sendo essas proteínas relacionadas a importantes processos fisiológicos. Segundo Rockman & Wray (2002), as histonas são reguladoras de expressão gênica no desenvolvimento dos ovos. No entanto, em nossas análises observamos maior interação de histona, proteínas de choque térmico (Hsp) e proteínas de ligação a DNA, presentes em ovos diapausa com as proteínas depositadas no banco de dados do String, sugerindo estas proteínas estão associadas a processos de regulação do estágio de dormência, auxiliando na manutenção. Porém os papéis da acetilação de histonas em ovos diapausa permanecem desconhecidos (Acevedo *et al.*, 2017).

As proteínas de choque térmico (Hsp68, Hsp70Ab, Hsp70Bc) e proteínas relacionadas ao metabolismo de energia (Eno, Tpi, PyK, PgK, Pglym78, Ald, Gapdh1, Gapdh2, blw, Oscp, ATPsyn-d, CG7813, CG5389, CG7610, CG1746, I(1)G0230) (Figura 4B), foram identificadas em ovos pós diapáusicos. Estas proteínas compreendem processos glicolíticos e metabolismo de ATP a qual apresentam função de defesa sob condições extremas, especialmente sob estresse e alta temperatura (Li *et al.*, 2009), além de serem ativas também no frio, seca, oxidação, estresse hipertônico, UV e metais pesados (Zhang & Denlinger, 2011). No entanto, as HSPs (proteínas de choque térmico) de insetos podem não estar associada apenas a resposta aos estresses ambientais, mas também estão envolvidas na recepção/tradução durante a programação para o término da diapausa (Moribe *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2013), contribuindo para o dobramento correto proteínas recém sintetizadas, protegendo-as contra desnaturação irreversível e promovendo a degradação de proteínas não recuperadas (Storey & Storey, 2011).

Assim, durante a diapausa, ocorre um processo fisiológico característico em níveis diferentes de metabolismo, a rede sHsp / Hsp70 / Hsp90 / Hsp60 tem potencial para impulsionar o dobramento e armazenamento de proteínas, influenciando a disponibilidade de ATP (adenosina trifosfato). A ligação do substrato ao Hsps é independente do ATP, porém um aumento da quantidade de sHsps-ATP potencializa a proteção da proteína, ou seja, se houver disponibilidade de

ATP, as proteínas podem se ligar de forma estável as Hsp70, Hsp90 e Hsp60 (King & MacRae, 2015). Nossos resultados corroboram com as evidências de que a presença de sHsps-ATP na diapausa dos ovos de *M. spectabilis* contribui para o aumento do metabolismo e auxilia na defesa das células contra a perda de proteína induzida pelo estresse durante a diapausa.

Em adição, também identificamos a proteína EF1 (fator de alongamento 1alfa), que atuam na iniciação da tradução, e proteínas ribossômicas (RpS19a, RpS2, RpS17, RpL27A, RpL13A, RpS16, RpL14, RpL9, RpL15, RpS8, RpS28b, RpS20, RpS23, RpS9, RpS10Ab, RpL4, RpS15, RpS3, RpLP2, RpS5a) em ovos não-diapausos. Esses componentes são importantes na regulação da tradução e síntese protéica, indicando que a tradução do mRNA e a síntese de proteínas é potencialmente mais ativa em ovos não-diapausos. Estas abundâncias de proteínas ribossômicas podem estar relacionadas à síntese protéica durante a embriogênese. Fan *et al.* (2013) observaram um aumento de proteínas ribossomais em análise proteômica via KEGG, bem como de vias do metabolismo, tradução e transcrição em ovos não-diapausos de *Bombyx mori*.

Gu et al. (2011), relatam que a fosforilação da proteína 4EBP parece ser a sinalização para a programação de término da diapausa em ovos de *Bombyx mori*, reforçando a hipótese de que o metabolismo biossintético de proteínas é um dos principais impasses entre diapausa e não-diapausa.

Nosso estudo mostrou que o desenvolvimento e os caminhos fisiológicos dos ovos de *M. spectabilis* estão relacionadas com a auto-proteção durante a diapausa e com desenvolvimento da embriogênico nos ovos não-diapausos favorecendo a sobrevivência da espécie e de futuras gerações no campo no período pós-diapausa. No entanto a identificação de proteínas envolvidas nesses estádios de desenvolvimento pode auxiliar pesquisas estratégica para a manipulação de populações de pragas, forçando-as ser ativas em condições desfavoráveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a EMBRAPA (EMBRAPA Gado de Leite-JF, Brasil) pela infraestrutura, disponibilidade de material vivo e assistência técnica. Ao NuBioMol (Centro de Análises de Biomoleculares-UFV, Brasil) assistência técnica e análise das proteínas. Ao Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos pela infraestrutura. Este estudo foi apoiado pelo INCT-IPP, FAPEMIG, CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- Acevedo, F.E., Bruce A. Stanley B.A., Anne Stanley, A., Michelle Peiffer, A., Dawn S.L., D.E., Felton, G.F. 2017. Quantitative proteomic analysis of the fall armyworm saliva. *Insect Biochem. and Molecular Biol.* 86, 81-92.
- Auad, A. M.; Carvalho, C. A. 2009. Desenvolvimento e viabilidade de ovos de *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) submetidos a diferentes regimes de hidratação. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo.* 76 (4), 711-714.
- Auad, A.M., Domingues, R., Machado MA, Souza LS, Carvalho GS, Paula-Moraes SV. Genetic variability of *Mahanarva* sp. (Hemiptera: Cercopidae) collected from different sites in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 9: 1005–1010, 2010.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Carvalho T.B., Zen, S. 2017. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências. *Pecege.* 3, 1.
- Costa, C., Meirelles, P.R.L., Silva, J.J., Factori, M.A. 2008. Evolution of the cultivated pastures and cattle in Brazil. *Vet. Zootec.* 15, 8–17.
- Chen C, Wei X, Xiao H, He H, Xia Q, et al. 2014. Diapause Induction and Termination in *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiinae). *PLoS ONE.* 9(5), 98145.
- Denlinger, D.L., Yocum, G.D. Rinehart J.P. 2012. Hormonal Control of Diapause. *Insect Endocrinology.* 430–463.
- Denlinger DL. 2002. Regulation of diapause. *Annual Review Entomology.* 47, 93122.
- Dias-filho, M.B. 2014. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Belém: EMBRAPA/CPATU (Documentos, 402).

- Fan L., Lin J., Zhong Y., Liu J. 2013. Shotgun Proteomic Analysis on the Diapause and Non-Diapause Eggs of Domesticated Silkworm *Bombyx mori*. PLoS ONE. 8(4), 60386.
- Fonseca M.G., Auad A.M., Resende T.T., Hott M.C., Borges C.A.V. 2016. How will *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) respond to global warming? J, Pest Sci. 16,1–6. <http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/iew005>.
- Gu, S.H., Young, S.C., Tsai, W.H., Lin J.L., Lin P.L. 2011. Involvement of 4E-BP phosphorylation in embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology. 57, 978–985.
- Guagliumi, P. Pragas da cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. Coleção Canavieira, n. 10, 1972.
- Hahn, D.A., Denlinger, D. L. 2011. Energetics of insect diapause. Annu. Rev. Entomol. 56, 103-121.
- Holmann, F., Peck, D.C. 2002. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. Neotropical Entomology, Londrina. 31, 275-284, 2002.
- Kostal, V. 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. J. Insect Physiol. 52, 113–27
- Košťál, V., Štětina, T., Poupardin, R., Korbelová, J., Bruce, A. W. 2017. Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 108, 41.
- Peck, C. 2002, Distribución y reconocimiento del salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) en la Costa Caribe de Colombia. Pasturas Tropicales. 24, 4-15.
- Resende, T.T., Auad, A.M., Fonseca, M.G., Sobrinho, F.S., Santos, D.R., Silva, S.E.B. 2013. The Damage Capacity of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) Adults on *Brachiaria ruziziensis* Pasture. Scientific World Journal 2013; 2013:281295.

Souza-Sobrinho, F. Borges, V. Léo, F.J., Kopp, M.M. 2010. Repetibilidade de características agronômicas e número de cortes necessários para seleção de *Urochloa ruziziensis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 45, 579-584.

Storey, K. B., Storey, Storey, J.M., 2011. Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation. Research and Reports in Biology. 2, 57-68.

King, A.M., MacRae T.H. 2015. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. Annu. Rev. Entomol. 60, 59–75.

Upton, M. 2004. The role of livestock in economic development and poverty reduction. PPLPI working paper no. 10. Pro-poor livestock policy initiative. FAO, Rome

Valério, J. R. 2009. Cigarrinha das pastagens. Rio de Janeiro: EMBRAPA Gado de corte. 179.

Zhang, Q, Denlinger, D.L. 2011. Molecular structure of the prothoracicotropic hormone gene in the northern house mosquito, *Culex pipiens*, and its expression analysis in association with diapause and blood feeding. Insect Mol Biol. 20(2), 201-13.

Zhou, G, Miesfeld, RL. 2009. Energy metabolism during diapause in *Culex pipiens* mosquitoes. J. Insect Physiol. 55, 40–46.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Identificação de proteínas dos ovos Diapausos, Não-diapáusos e Pós diapausicos de *Mahanarva spectabilis* por LC-MS.

Acesso	Proteína	Score	Peptídeos
Não-Diapausa			
B2BD67	Vitelogenina	83.64	YTIQSSVTTNK YPVHAFGR
E3WH90	Vitelogenina	43.92	DAVAEAGTGPALLTIK
B2BD67	Vitelogenina	62.34	YPVHAFGR
A0A151IEV1	Vitelogenina-1	62.79	NVPTWELNLLK
A0A151IEV1	Vitelogenina-1	0	NVPTWELNLLK
B4IP23	Histona H4	115.59	TVTAMDVVYALK ISGLIYEETR DNIQGITKPAIR
A0A075C4X2	Histona H2A	37.11	VGAGAPVYLAAVM(+15.99)EYLAAEVL ELAGNAAR
B4IN83	Histona H2B	66.36	HAVSEGTK AMSIMNSFVNDIFER
B4IMC5	Histona H2B	73.63	AMSIMNSFVNDIFER HAVSEGTK
H9IZ57	α -tubulina	51.11	LIGQIVSSITASLR
H9JV50	α -tubulina	102.81	TIQFVDWC(+57.02)PTGFK IHFPLVITYAPVISA EK
T1DQ28	α -hemoglobina	112.65	IGGHGAEYGAEALER FLASVSTVLTSK
T1E7Z1	α -hemoglobina	78.81	FLASVSTVLTSK IGGHGAEYGAEALER
A0A026X3R9	Actina	91.19	AGFAGDDAPR EITALAPSTIK DLYANTVLSGGTTM(+15.99)YPGIADR
A0A154PBX6	Actina	67.47	IAPEEHPVLLTEAPLNPK AGFAGDDAPR
B8Y197	Fator de alongamento 1α	65.50	M(+15.99)DSTEPPYSESR YYVTIIDAPGHR

B3NQ25	ATPase de transporte de cálcio	60.89	NILFSGTNVAAGK
A0A026WRY7	Ankyrin-2	34.08	EFAQLADYIDSR
B3GCD7	Isopropase cis-trans peptidil-prolique	58.10	HVVFGSVVEGMDIVK
D2A4R3	β -ATP sintase	50.92	TVLIMELINNVAK
A0A146LX34	β -Spectrin	47.48	LIAENNFR
D1LBX8	Ribosomal S5	38.84	TIAEC(+57.02)VADELINAAK
A0A084VJ18	AGAP013356	1	DLRVTTQR
A0A182MI61	Outros segmentos	44.65	EYNMVADALR
X1XR84	Não caracterizada	40.37	TPPGGE
A0A1B6MMG8	Não caracterizada	44.79	ILLELYYK
K7IRP4	Não caracterizada	47.59	VLEQLTGQQPVFSK
A0A1B6C1N7	Não caracterizada	50.75	ALGNIAHPR
A0A1B6E1L5	Não caracterizada	57.28	YSTETDEVYK
J9JRM2	Não caracterizada	61.23	AAVTGLGFLFR
A0A1B6L0Y6	Não caracterizada	71.45	DAVAQAGTGPALLTIK NLQVNIPIR
A0A1B6EBM7	Não caracterizada	81.41	YIIQSSVTTNK IFAPQHDLEVQYDGTGVK
A0A1B6DDC2	Não caracterizada	143.01	ALDSIQASLEAESK KLEADINELEIALDHANK DVQTALEEEQR SQLELSQVR QIEEAEIEAALNLAK NLADEVKDLLDQIGEGGR DELQAALAEAEAALEQEENK ANALQNELEESR
A0A1B6DHB6	Não caracterizada	126.78	IFAPQHDLEVQYDGTGVK YIIQSSVTTNK
A0A1B6L0Y6	Não caracterizada	99.34	DAVAQAGTGPALLTIK NLQVNIPIR
A0A1B6CLY7	Não caracterizada	77.33	ALGNIAHPR
A0A1B6D741	Não caracterizada	60.87	IYTNC(+57.02)C(+57.02)PQSTDR
A0A1B6EGC2	Não caracterizada	49.08	IIGWGEENGVK
A0A182UHL8	Não caracterizada	42.62	ASHAAC(+57.02)R

A0A026WAJ5	Não caracterizada	38.89	NAVAQAGTGPALLTIK
A0A1B6EBA7	Não caracterizada	35.80	KIVSALSKLSK
Diapausa			
B2BD67	Vitelogenina	59.67	YPVHAFGR
A0A151IEV1	Vitelogenina-1	37.69	NVPTWELNLLK
A0A0A8KZN4	Histona H4	85.86	TVTAMDVVYALK
A0A1A9W425	Histona H2A	58.41	LLSGVTIAQGGVLPNIQAVLLPK
H9IZ57	<i>α-tubulina</i>	72.22	LIGQIVSSITASLR
T1E7Z1	<i>α-hemoglobina</i>	95.97	IGGHGAEYGAEALER FLASVSTVLTSK
Q6WAW3	Proteína de choque térmico- Hsp70	60.60	VEIANDQGNR
A0A069DXP5	Cinase ativada por mitógenos	31.53	NPPPR
A0A1I8MMG5	Transportador de aminoácidos	33.16	QDAEPTLIR
C4WXA0	ACYPI009011	45.21	MVLTVDDITC(+57.02)TR
A0A1B6E1L0	Não caracterizada	89.43	LGQEFDEETPDGR MILTVDDIVC(+57.02)TR AIGVGGFFTR
A0A1B6EBM7	Não caracterizada	88.97	IFAPQHDLEVQYDGTGVK YIIQSSVTTNK
A0A1B6L0Y6	Não caracterizada	84.94	DAVAQAGTGPALLTIK NLQVNIPIR
A0A1B6CLY7	Não caracterizada	64.13	TNPSMQLLQR ALGNIAHPR TNPSM(+15.99)QLLQR
A0A1B6DMG8	Não caracterizada	46.50	AGGEIITFDELALR
A0A182L4P4	Não caracterizada	44.65	GSGGGGGGGPNRR
A0A182HNE4	Não caracterizada	41.77	DSYVGDEAQSK
A0A182MEX8	Não caracterizada	38.59	YWIAVNSWGK
A0A1B0EM04	Não caracterizada	32.22	LLLEVIDR
A0A182LXE1	Não caracterizada	32.00	HAAGDK

Pós-diapausa

B2BD67	Vitelogenina	88.94	YTIQSSVTTNK YPVHAFGR
B4IQA5	Histona H4	108.76	TVTAM(+15.99)DVVYALK ISGLIYEETR
A0A0L7RDX3	Histona H2A	70.15	LLSGVTIAQGGVLPNIQAVLLPK
H9JV50	<i>α-tubulina</i>	114.30	TIQFVDWC(+57.02)PTGFK LIGQIVSSITASLR DVNAAIATIK
F6M9L9	<i>β-tubulina</i>	79.60	IM(+15.99)NTYSVVPSPK
T1DQ28	<i>α-hemoglobina</i>	48.53	FLASVSTVLTSK
A0A0U4B5C7	Proteína de choque térmico- Hsp70	120.80	TTPSYVAFTDTER IINEPTAAAIAYGLDK VEIANDQGNR TFFPEEVSSMVLTK
A0A0P4VVE9	Isoforma muscular de actina	119.00	DSYVGDEAQS AGFAGDDAPR DLYANTVLSGGTTM(+15.99)YPGIADR HQGVM(+15.99)VGMGQK EITALAPSTIK
A0A0P4VVE9	Isoforma muscular de actina	119.00	DSYVGDEAQS AGFAGDDAPR DLYANTVLSGGTTM(+15.99)YPGIADR HQGVM(+15.99)VGMGQK EITALAPSTIK
A0A158P200	Acido aminolevulinico desidratase	103.48	IINEPTAAAIAYGLDK VEIANDQGNR DVDEIVLVGGSTR
A0A0K8W1R2	<i>β</i> -ATP sintase	80.59	IINVIGEPIDER FTQAGSEVSALLGR
A0A1B6FW63	Citrato sintase	67.01	ALGTLASLVWDR
A0A067R2J7	<i>β</i> -Spectrin	66.18	VQQLDAYAELVK
A0A193PCD1	Adenina nucleotídeo translocase	57.88	GFGVSVQGHIYR
A0A0Z7	Enolase	55.10	AVDNINKSIAPPELLK
A4V3G1	Fructose-bisfosfato aldolase	49.49	VTETVLAAYVK
J9JVQ8	Serina/Treonina fosfatase	48.56	EIFLSQPILLELEAPLK
Q5PXZ1	IDGF	37.75	TLLESVESR

A0A1B6DDC2	Não caracterizada	120.45	AQQELEEAEER ALDSIQASLEAESK GAYEEGQEQLAVR NLADEVKDLLDQIGEGGR KLEGELQTLHADLDELLNEAK
A0A1B6DHB6	Não caracterizada	93.44	YIIQSSVTTNK IFAPQHDLEVQYDGTGVK
A0A1B6CLY7	Não caracterizada	81.10	ALGNIAHPR
A0A1B6L0Y6	Não caracterizada	79.20	DAVAQAGTGPALLTIK NLQVNIPIR
A0A1B6EFU4	Não caracterizada	63.57	TNDIAGDGTTTATVLAQAIVR
A0A1B6CC82	Não caracterizada	52.97	YFTILEAGSR
A0A1B6CGM1	Não caracterizada	52.28	LWLVDGAPDFLK
K7JMJ3	Não caracterizada	42.99	SNPTVSYFLK
A0A1B6EGC2	Não caracterizada	42.20	IIGWGEENGVK

CAPÍTULO II

Effectors of the salivary gland of *Mahanarva spectabilis* modulating the response to infestation of elephant grass

Nayara Braga Saraiva, Nayara Braga Emidio, Camilo E. Vital, Michéla A. N. Gusmão, Danielle G. Marconato, Flaviane Silva Coutinho, Alexandre Machado Auad, Priscila Faria-Pinto, Humberto J. O. Ramos, Maria G. A. Oliveira. Effectors of the salivary gland of *Mahanarva spectabilis* modulating the response to infestation of elephant grass. Manuscript submitted.

Effectors of the salivary gland of *Mahanarva spectabilis* modulating the response to infestation of elephant grass

Nayara B. Saraiva ¹, Nayara B. Emidio², Camilo E. Vital ³, Michéla A. N. Gusmão², Danielle G. Marconato², Flaviane Silva Coutinho ^{1,3}, Alexander Machado Auad ⁴, Priscila Faria-Pinto², Humberto J. O. Ramos ^{1,2}, Maria G. A. Oliveira ¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Laboratory of Enzymology, Biochemistry of Proteins and Peptides, BIOAGRO/INCT-IPP, Federal University of Viçosa, UFV, Brazil.

² Department of Biochemistry, Laboratory of Protein Structure and Function, Federal University of Juiz de Fora, UFJF, Brazil.

³ Center of Analysis of Biomolecules, NuBioMol, Federal University of Viçosa, UFV, Brazil.

⁴Laboratory of Entomology, Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Dairy Cattle, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author: Humberto J. O. Ramos

Email: humramos.ufv.br@gmail.com

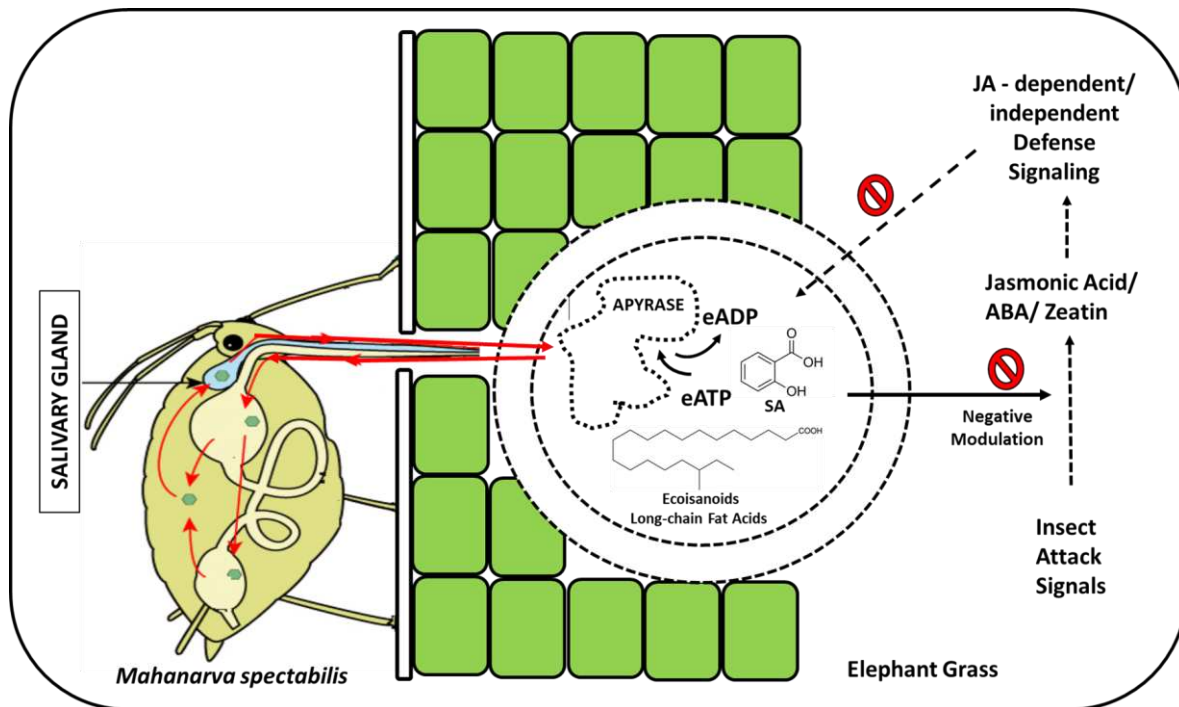
ABSTRACT

Plant perception of signals at first stages of the insect attack are determinants to trigger specific physiological alterations that confer resistance. Thus, the molecular characterization of both insect effectors and plant hormonal regulators are essential to the development of the resistant genotypes of forages grasses to the infestation by *Mahanarva spectabilis*. Applying biochemical and mass spectrometry tools, we evaluated the presence of effectors in the salivary glands of *M. spectabilis* that could be related to high capabilities of infestation of elephant grass. The presence of an NTPDase apyrase-like was confirmed and higher activities were observed for females hydrolyzing ADP. High levels of long chain fat acids, such as Octadecanoic acid (19.5%), Prostaglandin A2 (4.7%) and Eicosanoic acid and of the phytohormone salicylic acid (~3.0 ng/g) were also detected in the salivary glands. After 24hs of infestation, the phytohormone profiles were altered specifically when of presence of leaf damages by *M. spectabilis* and could be an indicative of the modulation by insect effectors that suppressed the plant response. Our results further suggest that this may be a result of crosstalk between the SA, JA, ABA and Zeatin pathways, as an effect of the SA induction.

Our results demonstrate that the presence of the spittlebugs interfered with JA and Zeatin accumulation in elephant grass plants.

Key words: Fat acids; apyrase; phytohormone; jasmonic acid; salicylic acid

ABSTRACTGRAPHIC



Fonte: Humberto Ramos

INTRODUCTION

Effector molecules secreted by the salivary glands of insects during infestation lead to a reprogramming of the plant metabolism for the defense of the attack (Gatehouse 2002; Guiguet et al., 2016). A number of recent discoveries have shifted attention to damage-associated molecular patterns (DAMPs) involved in the earliest events that occur during plant attack by herbivorous insects (Maffei et al., 2007; Zebelo and Maffei, 2015). These include the plant perception of specific physiological alterations that occur at the attack site, including the release of extracellular ATP, the elevation of cytosolic calcium concentration, and the production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species (Zebelo and Maffei, 2015). These responses originate at the plant cell plasma membrane, and are triggered both physical damage and by molecules from the herbivores. The elicitors of these responses can be low mass compounds, such as FACs (fatty acid-amino acid conjugates), inceptins, caeliferins, bruchins, as well as high mass molecules, such as the enzyme glucose oxidase (Acevedo et al., 2015; Shinya et al., 2016; Aljbory and Chen 2018). Besides their mass, insect elicitors may differ in origin and/or molecular function, such as herbivore-associated elicitors (HAEs) derived from insects, damage-associated molecular patterns (DAMPs) from plants, effectors, and microbes (Zebelo and Maffei 2012; Acevedo et al., 2015).

In animals and plants, a diverse array of extracellular enzymes helps control extracellular ATP. Among them, apyrases play a major role (Guiguet et al., 2016). Apyrases, also named Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases—3.6.1.5), are a family of enzymes that hydrolyze nucleosides triphosphates and diphosphates upon bivalent metal ion. Among the hematophages that possess apyrase activity in the salivary gland are a variety of ticks (Stutzer et al., 2009). However, there are few studies of this enzyme in the salivary gland in sucking insects. In plants, the recent identification of the DORN1 eATP receptor in *A. thaliana* has stimulated interest in the study of apyrases modulation plant response to herbivory (Tanaka et al., 2014) because could be involved in the control extracellular ATP (Detoni et al., 2012).

Given emerging links between these molecules to the plant growth and defense, have been propose that these effectors interfere with phytohormone signaling (Schultz and Appel 2004; Schmelz et al., 2008). Oral secretions also have important functions for herbivores, as some components are active for interfering with plant defense-signaling pathways (Nabity et al., 2013; Giron and Glevarec, 2014). The phytohormones most often associated with mediating plant responses to insects are jasmonic acid (JA), Ethylene, and salicylic acid (SA) (Nguyen et al., 2016). The spittlebugs is the generic name for a complex of spittlebugs that attack almost all important

genera of forage grasses, such as *Brachiaria*, *Cynodon*, *Panicum* and *Pennisetum*, and are considered limiting insects-pests in livestock production of tropical America (Holmann & Peck, 2002). The genus *Mahanarva* is among the main genera of spittlebugs that occur in Brazil and are harmful to forage grasses (AUAD et al., 2007; Auad et al., 2010; Fonseca et al., 2016). The nymphs feed on the roots, inserting their stiletos in the xylem vessels and sucking the sap, thus destroying the conducting vessels, which hinders the transport of water and nutrients, weakening the plant and causing the symptom known as physiological disorder (BYERS WELL, 1966). However, the main damage is caused by adults who, when feeding, inject toxins present in the saliva, causing yellowing and drying of the leaf, reducing the photosynthetic capacity of the plant (Resende et al. 2013; Fonseca et al., 2016).

In this study, the presence of effectors in the salivary glands of *M. spectabilis* was investigated applying diverse analytical tools. The presence and activity of an NTPDase was confirmed and is an indicative that it could be involved in the susceptibility of elephant grass to the infestation. Applying LC/MS approaches was also verified the presence of several long chain fat acids derivatives also as putative effectors. Interesting, high level of the SA were detected in the salivary gland and could be involved in the fluctuation of phytohormone levels observed in the elephant grass leaves. The role of these effectors in the molecular signaling between *M. spectabilis* and elephant grasses are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Plants and Insects

Plants of *Pennisetum purpureum* and *Mahanarva spectabilis* used were kindly provide by Embrapa Dairy Cattle, Brazil. The plant grown in 500-mL pots containing soil and were and maintained in a greenhouse temperature $\pm 27^{\circ}\text{C}$ and relative humidity $\pm 81\%$) for 30 days. The developmental stages males, females and nymphs were collected from experimental station from Forage Breeding Programme of Embrapa.

Preparation of the gland homogenates and Enzymatic Assays

To prepare cell homogenates of the salivary glands were processed 10 insects and the salivary glands were removed by excision using a fine-tipped tweezers. The pool containing the excised salivary glands were placed in buffer containing 5 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 8% sucrose, leupeptin (0.5 $\mu\text{g/mL}$), pepstatin (0.07 $\mu\text{g/mL}$), trypsin inhibitor (50 $\mu\text{g/L}$) and phenylmethylsulfonyl fluoride (2 $\mu\text{g/mL}$). The homogenate was prepared by 3 cycles in ultrasonic

bath (Ultrasonic Cleaner, Unique 700) by 5 min followed of freeze-thaw in liquid nitrogen. Samples were centrifuged at 600 g for 10 minutes and the supernatant was collect to new Eppendorf tube. The protein concentration was determined by the method of Lowry, using bovine serum albumin as a standard (Lowry, 1951). Aliquots from homogenates of the salivary (0.1 mg/mL) were used to measure phosphohydrolytic activity in triplicate in standard reaction medium containing MOPS(3-(N-Morpholino) 50 mM pH 7.4, 5mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl , 5mM KCl and 10mM azide. The reaction was initiated by adding 3 mmol/L of the substrate ATP at 37°C and stopped after 60 minutes with addition of 0.1 N HCl. The amount of inorganic phosphate (Pi) liberated was determined spectrophotometrically according to Taussky and Schorr (1953). Each assay was performed in triplicate, using tissue samples obtained from each group. The mean of each triplicate was calculated, and value with a variation of more than 15% between them was discarded.

Zymogram of the NTPDase activity

A nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis was performed with a 6% polyacrylamide gel plus 0.1% (v/v) Triton X-100 and 0.1% (w/v) sodium deoxycholate added in running buffer. Aliquots from homogenates containing 120 µg of proteins were homogenized in 0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 0.2% sodium deoxycholate, 0.2% Triton X-100, 5% bromophenol blue and were submitted to electrophoresis using a Mini-Protean III Cell (Bio-Rad) apparatus for approximately 4 h at 130 V. The gel was washed twice for 20 minutes with 50 mmol/L MOPS (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid) buffer, pH 7.4 and incubated at 37°C in fresh 50 mmol/L MOPS buffer, pH 7.4, supplemented with 10 mmol/L CaCl₂ and 5 mmol/L ATP. Approximately 12 hours later according to Detoni et al. (2012), the presence of white calcium phosphate precipitates were evaluated as indicative of the phosphohydrolytic activity and the images were photographed against a dark background.

Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Aliquots of the 120 µg the homogenate protein were solubilized in gel loading buffer and submitted to sodium dodecyl sulphate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using the MiniProtean III Cell system (Bio Rad Laboratorios Brasil Ltda, Brazil), as described by Laemmli (1970). The proteins were electroblotted onto nitrocellulose membrane, followed by a blocking step with a solution containing 0.15 mol/L phosphate buffer solution, pH 7.4, plus 0.3% Tween-20 and 3% casein. Western blots were developed with rabbit anti-potato apyrase (diluted 1:1,000). Signals were revealed by chemiluminescence with anti-rabbit IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:1,000) using luminol substrate (GE Healthcare, Brazil) and exposed

to X-ray film.

Immunolocalization of the NTPDase in the Salivary Glands of *M. spectabilis*

Immunolocalization was performed by immunofluorescence, as previously described by Zimmermann (2001) with modifications. The insects were dissected in 0.5% v/v glutaraldehyde and the salivary glands were removed and fixed in 4% v/v paraformaldehyde and 0.2% v/v Triton X-100 for one week at 8 ° C. After washing with the buffer PBS and 0,05% v/v Tween, the tissues were post fixed in the same buffer and block with 4% v/v FCS (fetal calf serum) for 1h. The slides were incubated for 12 h at 4 ° C with anti-potato apyrase antibodies (1: 500). The slides were washed 3 times in PBS and 0.05% Tween and incubated for 60 min with anti-mouse IgG antibody conjugated with rhodamine (1µg/ml) (Rhodamine Red, Molecular Probes). After incubation, the glands were again washed 5 times with buffer, and incubated with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole / Invitrogen-1µg /ml), followed by further washes. Signals were revealed by on the immunofluorescence microscope, Olympus BX53 equipped with DP73 digital camera. The images were captured and edited by the CellSens Dimension® program.

Hormone Analysis

For analysis of hormones produced by the insect, the salivary glands were extracted of 10 adults of *M. spectabilis* (5 male and 5 female). The salivary gland were placed in a 1.5 mL Eppendorf tube and were added 400 µL of the a solution containing methanol, isopropanol and acetic acid (20:79:1). The hormones were extracted by four cycles of vortexing by 20 s and sonication by 5 minutes. The mixture was placed on ice for 30 min then centrifuged at 13000 x g for 10 min at 4 °C (Muller and Munné-Bosch 2011). The supernatant was carefully removed and the pellet re-extracted with 400 µL methanol, isopropanol and acetic acid (20:79:1). Following, the extract were incubated again by 30 min on ice, centrifuged and the supernatants were pooled.

For extraction of the phytormones from elephant grass, each vessel with an plant were kept a growth chamber (50 cm high x 10 cm in diameter) containing 10 insects adults of the *M. spectabilis* (5 males and 5 females). Every time of 0 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours of infestation by to *M. spectabilis*, the plant leaves were collected and stored at -80°C. For simulation of the mechanical damages the elephant grass plants were injured with 10 softs perforation by pin randomly along of the leaves. The treatments were performed in triplicate. The leaves were powdered in liquid nitrogen and 110 mg fresh weight was extracted in 400 µL of the a solution containing methanol,

isopropanol and acetic acid (20:79:1). The phytohormones were extracted by four cycles of vortexing by 20 s and sonication by 5 minutes. The mixture was placed on ice for 30 min then centrifuged at 13000 x g for 10 min at 4 °C (Muller and Munné-Bosch 2011). The supernatant was carefully removed and the pellet re-extracted with 400 µL methanol, isopropanol and acetic acid (20:79:1). Following, the extract was incubated again by 30 min on ice, centrifuged and the supernatants were pooled.

A aliquot of 300 uL of the extracts from leaves and other 300 uL of the salivary glands insect were placed in vials and 5.0 µL was injected into the LC/MS system from NuBioMol (Center for Biomolecules Analysis – UFV, Brazil). We used a chromatography column (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) with a flow rate of 0.3 ml/min, coupled online to a mass spectrometer QQQ triple quadrupole Agilent 6430. The mass spectrometer was operated in a negative mode according to retention time for each hormone and the sample scanned by MRM (multiple reaction monitoring) for detecting each hormone as shown in Table S1. The generated mass spectra were processed using the Skyline software to obtain the extracted chromatograms (XIC) of each transition and to obtain the area values as indicative of the abundance of each hormone. A standard curve of each hormones varying concentrations of 0.1 to 300 ng/mL was used to convert the area values from XIC in ng/g of plant tissue and salivary glands.

Metabolic profiles of the salivary glands of *M. spectabilis*

The salivary glands of 10 insects were added in 1.5 ml of cold extraction solution water: methanol:chloroform (1:2.5:1) containing 60 uL of ribitol (0.2 mg/ml stock in water) as an internal quantitative standard. The extracted by four cycles of vortexing by 20 s and sonication by 5 minutes. The samples were shaken in Thermomix for 30 min at 4 ° C, centrifuged at 14,000 g for 5 min and the supernatant was collected. After then 750µL of water was added and the samples were vortexed, followed by centrifugation at 14000 g for 5 min. An aliquot of 50 µL of the supernatant was transferred into a new tube and dried by vacuum centrifugation. The dried samples were dissolved in methoxyamine pyridine (40µL of a 20 mg/mL solution), homogenized in a vortex for 30 s, and then incubated for 2h at 37 °C stirring. Lastly, 70µL of N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) reagent (20uL / mL of retention time standard) was added and the mixture was incubated for 30 min at 37 °C (Lisec et al. 2006). Metabolic extracted were analyzed using an Agilent 7890A GC System coupled to Mass Spectrometric TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipped with a capillary column of 30mm (MDN-35) operating according to Lisec et al (2009). Samples were injected in splitless mode at 230 °C using a gas flow (continuous flow of helium) of 2 mL/min. The oven temperature was initially maintained constant at 80° C and then increased to

15°C/min to reach 330°C, this temperature being maintained for 5 min. Mass spectrum was obtained by the full-scan method ranging from 33 to 600 m/z. A series of n-alkanes was used along with samples to calculate retention indices. Raw GC/MS data were processed and converted to the CDF format (NetCDF) using the ChromaTof package and analyzed by TargetSearch algorithms (Cuadros-Inostroza et al. 2009). We used a script for identification and quantification of metabolites designed to run on R package (Cuadros-Inostroza et al. 2009) and the processing parameters and alignment utilized was optimized for our GC/TOF platform. The parameters used were: mass range of 85-500 Da; IntThreshold 50; TopMasses 10; r thresh of 0.05; quality index threshold 600. The compounds identification were determined by database searches based on the combination of the mass spectrum and chromatographic retention indices by TAG-based method (Cuadros-Inostroza et al. 2009). In this search was used a metabolites fragmentation library by electron impact (EI) and retention index (RI) GMDB_FAMELib_TS_20110228_IS.txt, generated by GMD Mass Spectrum Reference Library (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/download/>) that was generated using the same configuration of our GC/MS platform. A filtered identification table containing the identified compounds and their intensities were submitted to pathway analysis of the Metaboanalyst platform (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

RESULTS

NTPDase activity from the salivary gland

In order to verify the presence of the apyrase in the salivary extracts, an NTPDase activity assay was performed under nondesaturating conditions of three developmental stages (Fig. 1). Hydrolysis of ATP and ADP were observed for all samples, except for males when substrate was ADP (Fig. 1). The activity in the females extracts were more pronounced when the substrate was ADP (2 fold) and was higher than the males and nymphs of *M. spectabilis*. The zymogram analysis confirmed the presence of the ADPase activity in the salivary glands extracts (Fig. 2).

Identification and localization of Apyrase in salivary gland of *M. spectabilis*

For confirmed the presence of apyrase in the salivary gland was performed a western blotting using the homogenates in SDS-PAGE (Fig.3) against an anti-potato apyrase antibodies, was described in Faria-Pinto et al, 2004. The apyrase biosynthesis in the salivary gland was confirmed by the presence of a signal at approximately 58 kDa for the all from nymph, males and females (Fig. 3). This result suggest that a protein homologous to NTPDase was expressed in salivary gland

of *M. spectabilis*. The immunolocalization assay of the apyrase within secretory cells of females of *M. Spectabilis* confirmed the expression of the apyrase in those tissues (Fig. 4) and was localized throughout the acini cells, punctate staining is evident in the cells in red (Fig. 4B). Anti-potato apyrase antibodies further bound to vesicular structures within the secretory cells, indicating the presence of NTPDase.

Phytohormones responsive to the infestation by *M. spectabilis*

Seven phytohormones were evaluated in the leaves of the elephant grass under infestation by *M. spectales* by LCMS (Table S1). The concentration of the each phytohormone and treatment were combined and analyzed in the MetaboAnalyst platform www.metaboanalyst.ca (Xia et al., 2015). Quality Filters based on the standard deviation method were used to automatic remove of the low-quality data and after then the intensity values were normalized by sum. The data were analyzed using the Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) for generate 2D Scores Plot displaying the effect phytohormones and treatments on the data grouping. The phytohormone response were distinct for the leaves exposed to the insect (IN) and injured by a mechanical damage (DM) after 48 and 72 hours (Fig. 5A) and was a indicative that the phytohrmone levels also responsive when the leave were injured by pin. Thus, the effect of the insect infestation and mechanical damage were evaluated separately. In the Fig. 5B, we can observed clearly separation of the variance from the experiment in two distinct groups, which reflect the infestation times. The first principal component (PCA 1) explained greatest variance (93%) across the data and the exposition time of 24h were grouped separately (Fig. 5B). The phytohormones jasmonic acid (JA), abscisic acid (ABA), Zeatin 1 and indolacetic acid (AIA) increased the concentration in the infested leaves until 24h, followed of a progressive reduction (Fig. 6). In contrast, for the salicylic acid (SA) was observed a reduction after 24h, followed of a progressive increasing. For the methyl jasmonate and ACC were not observed significantly alterations. Despite of have been observed alteration in the phytohormones leaves in response to the mechanical damage, the behavior was completely different those observed for the insect infestation (Fig. 7). The JA and ACC showed a progressive increasing at long of time, while the SA in contrast was decreasing. The Zeatin and AIA increased after 24h, followed of a progressive decreasing (Fig. 7).

Metabolic profile of the salivary gland

Metabolic profile performed by GC/MS reveal the compound present in high abundance and those that are present in the spectral library used for identifications. Using this approach, we identified 416 compounds showing signal over 500 and quality factor over 600 (Cuadros-Inostroza

et al., 2009). The most abundant compounds and their intensities were submitted to pathway analysis (Fig. 8). The more representative metabolic pathways were for arginine and proline metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, galactose metabolism and fatty acid biosynthesis (Table 1). Some of the most abundant compounds were classified as lipids, which showed relative intensities over 1%: Octadecanoic acid (19.5%); Phosphoric acid (16.5%), Prostaglandin A2 (4.7%), Tetradecanoic acid (2.4%), Hexadecanoic acid (1.7%), Heptadecanoic acid (1.6%), Heptadecanoic acid (1.5%), Eicosanoic acid (1.4%), Methyl palmitate (1.3%).

The salivary extracts analyzed by LC/MS indicated the presence of the phytohormones SA, AIA e MeJA (Table 1). High concentration was detected for SA (~4.0 ug/g fresh gland).

DISCUSSION

Recent discoveries for salivary effectors produced by herbivores species have been reported, however their genetic and functional characterization is a challenge. The plant defense involves recognizing the molecules belonging to the invading organism. Thus, the molecular characterization of these effectors is essential to understand the mechanism of plant resistance to insect attack and for the development of new genotypes by genetic engineering (Gatehouse, 2002; VanDoorn and De Vos 2013). However, for attained this is necessary the knowledge of the molecular determinants of the interaction *M. spectabilis* and the host plants. In this context, the oral secretions also have important functions for herbivores, interfering with plant defense-signaling pathways.

The effectors involves high mass molecules, such as proteins and low mass, such as fat acid-amino, acid conjugates (Stanley 2005; Wu et al., 2007; Walley et al., 2013; Tanaka et al., 2014; Stanley and Kim 2014). One of these including enzymes Apyrases, recently have been characterized in plants (Choi et al., 2014; Tanaka et al., 2014) and is involved in the control the concentration of extracellular ATP in the plant tissues. The confirmation of the presence of the apyrase in the salivary of *M. spectabilis* is also indicate of their involvement in the infestation of grasses. The activities apyrase releasing ADP was higher in females was similar to that observed by Detoni et al., (2012) in galls, where insect-borne tissue greatly increases ADP activity. In addition, the apyrase showed be highly activate also in the gland tissues and presumably due to their ability to modulate extracellular ATP levels (Tanaka et al., 2014). The detection of active ATP hydrolyzing enzymes, such as apyrases in the salivary glands of *M. spectabilis*, leded us to verified the phytohormonal balance in the elephant grass leaves under infestation. The phytohormones most often associated with mediating plant responses to insects are jasmonic acid (JA), and salicylic acid (SA) (Nguyen et al., 2016).

Jasmonates are key regulators of plant responses to damage, necrotrophic pathogens, and insect herbivory, whereas by modulates the magnitude of direct and indirect plant defenses produced in response to jasmonates (Schultz and Appel 2004; Nguyen et al., 2016). We observed until 24hs of infestation an increase of the JA and a reduction of the SA (Fig5). However, after 24hs it was reverted, with JA decreasing and SA increasing. SA has been shown to correlate negatively with JA accumulation (Nguyen et al., 2016) and where accumulation of SA results in a negative feedback reducing JA accumulation. In accordance, Schwartzberg and Tumlinson (2014) conclude that both aphid feeding and exogenous honeydew deposition suppress JA accumulation in response to damage and that honeydew application results in an increased accumulation of SA within plant tissue.

Other phytohormones, such as abscisic acid (ABA) and cytokinins (CKs) have more recently emerged as important defense regulators as well (Schäfer et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Zhang et al., 2017). Until 24hs of the infestation by *M. spectabilis*, the levels of the ABA reaching at the maximum, however after 72hs it was reduced at the same proportion that was observed for JA. ABA has been involved in signaling process inducing JA-dependent defense responses in systemic tissues (Nguyen et al., 2016). Thus, the increased of SA observed in elephant grass leaves could be a modulated response by effectors present in the saliva that blocked the plant defense and allowed spittlebug infestation for long times (Schmelz et al., 2008). However, when the leaves were injured by a mechanical damage by pin were observed responses to hormonal levels completely distinct (except for IAA), which is an indicative that the presence of the insect is involved in the modulation of the plant response. The high levels of SA (Table 1) were detected in the salivary gland of *M. spectabilis* could also alter the phytohormonal balance in the plant tissues under the contact with the sucking apparatus. It has been suggested that insect-associated microbes may facilitate host plant use (Hansen and Moran 2014) and thus symbionts present in the salivary glands could be responsible for the biosynthesis of metabolites including SA.

Zeatin are plant hormones involved in numerous plant-biotic interactions and an increase in its concentrations is commonly observed after insect or pathogen attack, suggesting to be used to modified the plant metabolism and to allow the infestation plant (Giron *et al.*, 2013; Zhang et al., 2017). The levels of Zeatin likewise JA, increased until 24h, following of a decreased bellow the background level. The antagonist effect of the SA apparently blocked also the Zeatin effect after 24hs. Therefore, cytokinins like Zeatin might also be involved in the regulation of plant response to infestation by *M. spectabilis*. JA-mediated defense responses, such as proteinase inhibitor accumulations, were found to be promoted by CKs (Dervinis et al., 2010). It is in accordance with the concomitant reduction observed for the JA and Zeatin after 24hs in elephant grass leaves. In

addition, the levels of the Zeatin after mechanical damage was also distinct of those observed for infestation and was again an indicative that salivary injection altered the metabolism also for this phytohormones (Fig. 6).

The suppression of JA observed leaves infested of *M. spectabilis* could be also due to ATP degrading enzymes, as a direct or indirect effect through the upregulation of SA-dependent plant defenses (Wu et al., 2007). Interesting, ABA can also trigger ATP release during plant stress response (Tanaka et al., 2014) and play a very important role in plant resistance against insect herbivores through a modulation of JA-driven defense responses (Giron et al., 2013; Erb et al., 2012; Dinh et al., 2013). ABA also acts as an antagonist of CKs (Schäfer et al., 2015). We also observed a concomitant reduction of the Zeatin with the increase of the ABA levels after 48hs of the infestation (Fig. 6).

Mechanical wounding of plant tissues is an inevitable consequence caused by insect herbivory. However, abiotic and biotic wounds are perceived distinctively by the plant, as it has been demonstrated in different plant-herbivore interactions (Schmelz et al. 2008; Giron et al., 2013; Zhang et al., 2017). Insect wounding and chemical interactions thus play a vital role in recognition of the type of the damage by the plant. Thus, plants are able to differentiate between mechanical wounding and herbivory damage, which indicates the recognition of insect specific molecules by the plant. We observed several long chain fat acids and derivatives present in high relative abundances in salivary glands *M. spectabilis* (Table 1), which could acting as elicitors or blocked of the response of elephant grasses leaves to the infestation. In plants, fatty acid signals are called “oxylipins” (Walley et al., 2013) and are produced via enzymatic oxidation of linoleic or linolenic and major product of this pathway jasmonic acid (JA). The potential for specific signaling between plants and herbivores via fatty acids have been suggested and that diverse fatty acid-derived can elicit diverse plant responses (Stanley and Kim 2014), and that some plants can use arachidonic acid to produce analogous oxylipin signals. Additionally, these signals could also suppress defense responses in plants, as they do in vertebrate hosts (Stanley 1999).

Other lipids were detected in high level including eicosanoic acid, prostaglandin D2 and A2. Prostaglandins and other eicosanoids are oxygenated metabolites of certain polyunsaturated fatty acids. Prostaglandins and other eicosanoids are central operators in insect immune signaling and have been suggested that plant defense responses can be mediated by these lipids (Schultz and Appel 2004; Stanley and Kim 2014). The activation of defense genes in tomato plants has been shown to be mediated by an octadecanoic acid-based signaling pathway in response to herbivore attack or other mechanical wounding and plants deficient in their production are also compromised in their ability to accumulate jasmonic acid (Howe et al., 1996). Thus a presence of high relative

abundance of octadecanoic acid (19%) in the salivary glands of *M. spectabilis* could dispartate the biosynthesis of JA in local area of the injection and contribute for the increased observed after 24hs (Fig.7).

CONCLUDING REMARKS

In summary we have identify some elicitors present in the salivary gland of *M. spectabilis* that could be related to infestation of elephant grass. Apyrase activities and higher levels of long chain fat acids and salicylic acid were detected in the salivary glands. After 24hs of infestation, the phytohormones profiles were altered specifically when of presence of leaf damages by *M. spectabilis* and is an indicative of the modulation by insect effectors that suppressed the plant response. Our results further suggest that this may be a result of crosstalk between the SA, JA and Zeatin pathways, as an effect of the SA induction. Our results demonstrate that the presence of the spittlebugs interfered with JA accumulation in elephant grass plants.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank to NuBioMol (Center of Analyses of Biomolecules-UFV, Brazil and Protein Structure and Function Laboratory-UFJF, for the infrastructure, technical assistance and performed analyzes. The Embrapa Dairy Cattle, Brazil by the provision of plants and insects. This study was supported by the National Institute of Science and Technology in Plant-Pest Interaction (INCT-IPP), The Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

FIGURES

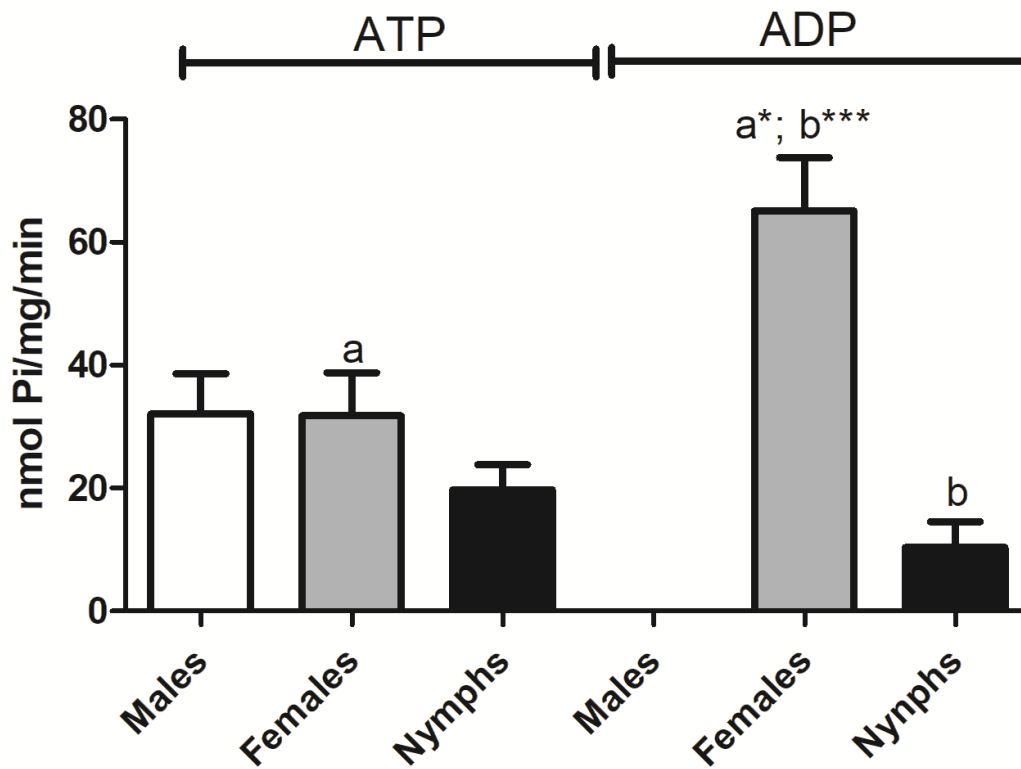


Figure 1: NTPDase activity of the homogenate of, males, females and nymph of *M. spectabilis*. Hydrolysis of ATP or ADP was measured from the total homogenate of nymphs, males and females of *M. spectabilis* in standard reaction medium (50 mM MOPS, pH 7.4, 1 mM ouabain, 10 mM azide, 5 mM CaCl₂, MgCl₂ 2 mM, 150 mM NaCl, 5 mM KCl) containing ATP or ADP as substrates. Results represent the mean of 3 independent experiments, made in triplicate. Data are reported as mean \pm SD. Statistical analysis: ANOVA with Tukey's post-test. *P < 0.05***P < 0.001.

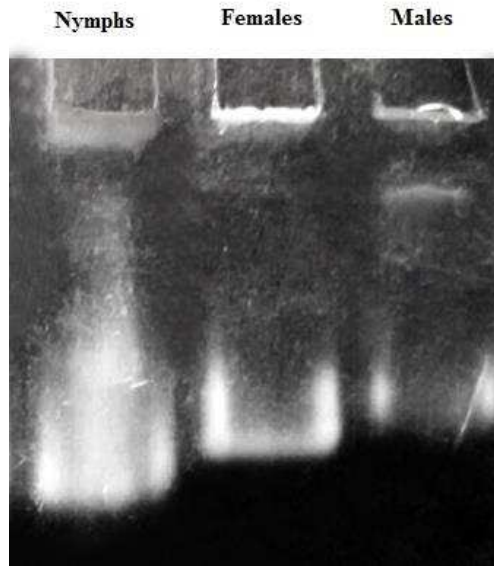


Figure 2: Zymogram result of the ADPase activities from homogenate salivary glands of nymph, females and males of *M. spectabilis*. Regions showing the white regions generated by calcium phosphate precipitates are indicative of the phosphohydrolytic activity.

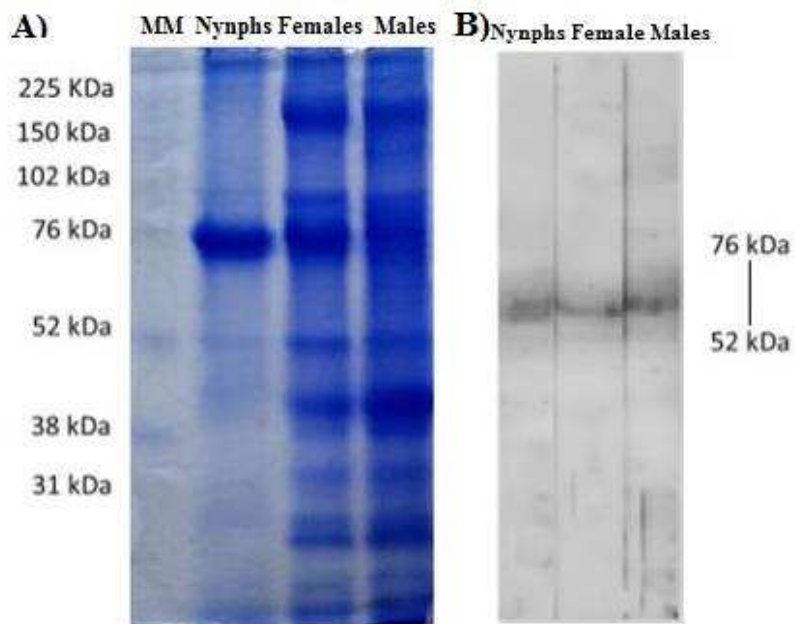


Figure 3: Identification of NTPDases isoforms from salivary gland of *M. Spectabilis* by western blotting. In (A) the SDS-PAGE stained with Coomassie blue. In (B) Western blotting revealed by chemiluminescence from secondary antibody. Presence of Apyrase-like proteins are indicated by the signals between 76–52 kDa. Nymphs; Females and Males.

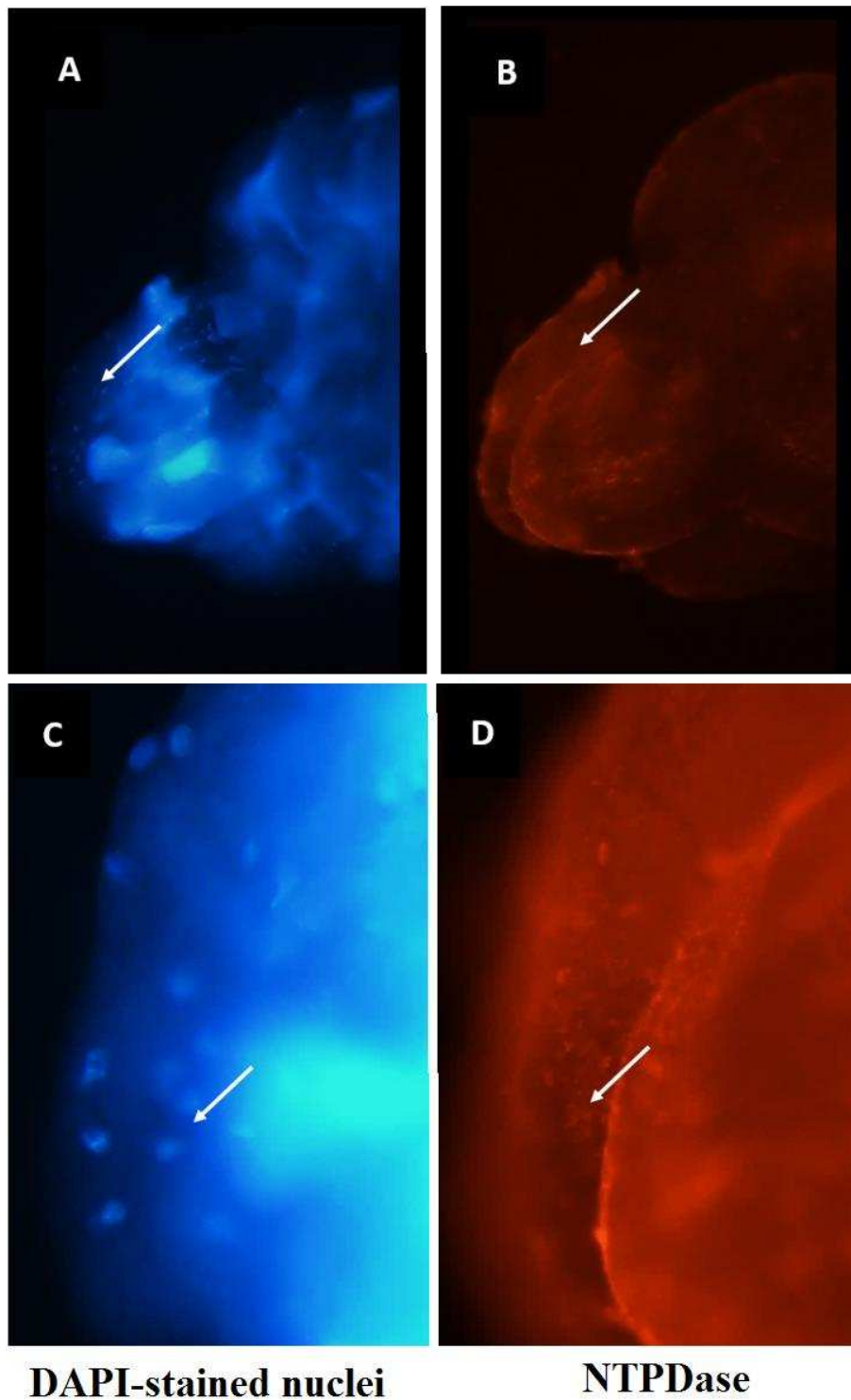


Figure 4: Immunofluorescence localization Apyrase within secretory cells of females of *M. pectabilis*. In (A) DAPI-stained nuclei (blue) (arrows), (B) Labelling of a longitudinal section through a salivary glands stained with anti-NTPDase 1 antibodies (red)(arrows), in (C and D) zoom of previous images.

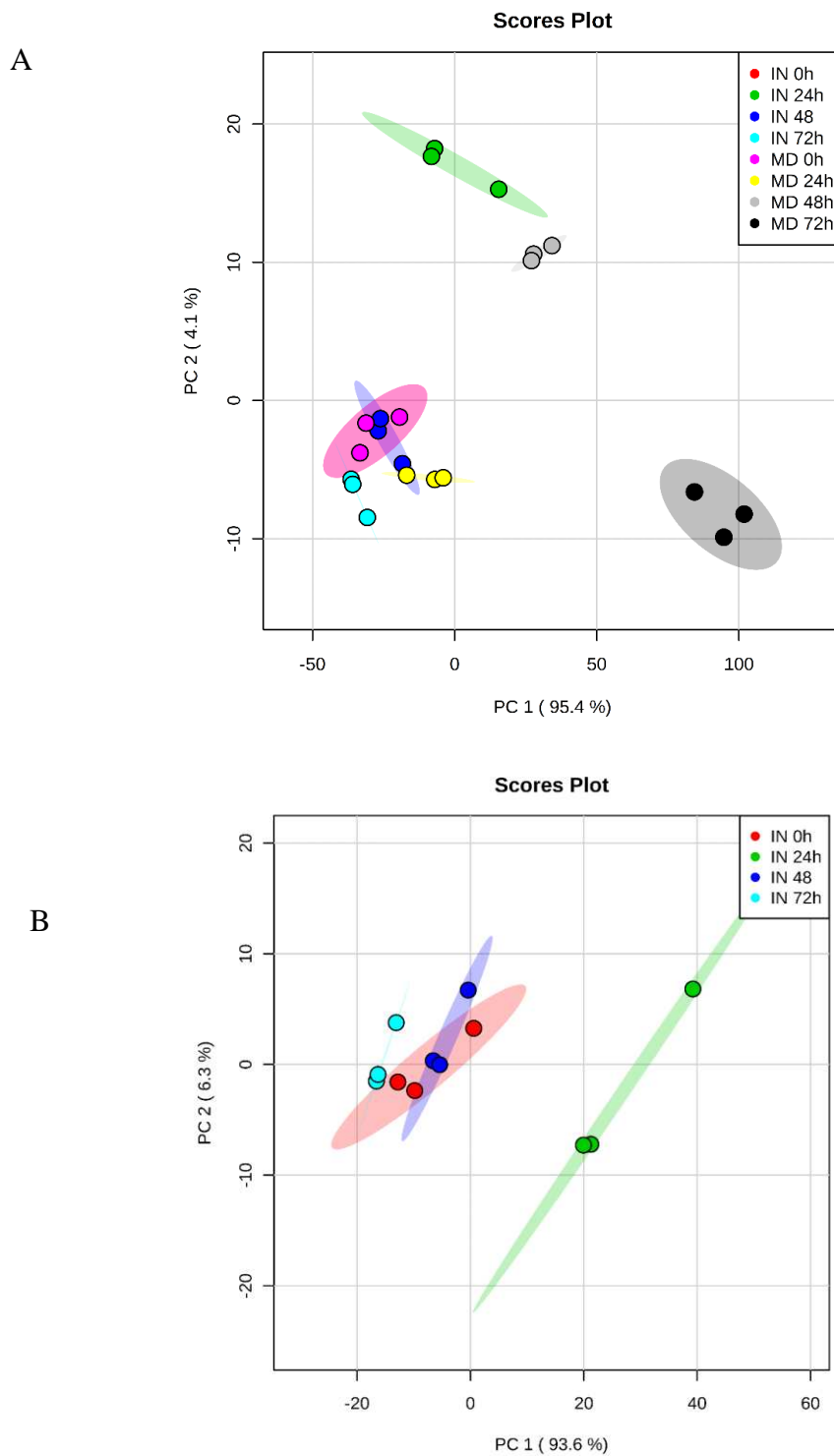


Figure 5: Clustering analysis by *PCA* (*principal component analysis*) method of the phytohormones quantified of the elephant grass leaves in different times of injury by *M. spectabilis* (IN) and by mechanical damage (DM). In (A) the behavior of the experimental variances when the different treatments IN and DM are compared. In (B) the pattern of response of the phytohormone a long of the time of the infestation.

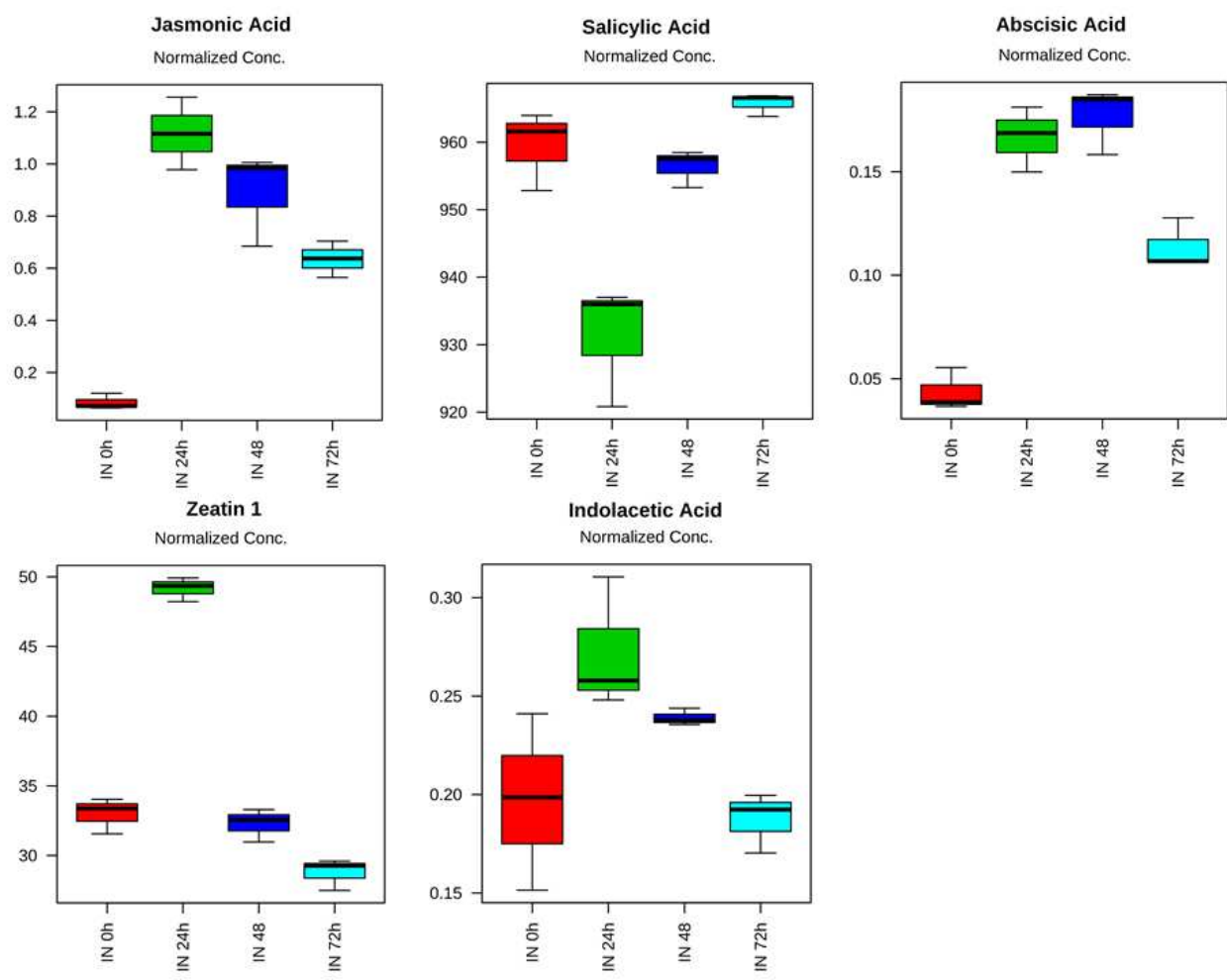


Figure 6: Phytohormones quantified by LC/MS from the elephant grass leaves injured by *M. spectabilis* (IN) different time of infestation. The data were analyzed by Metaboanalist platform.

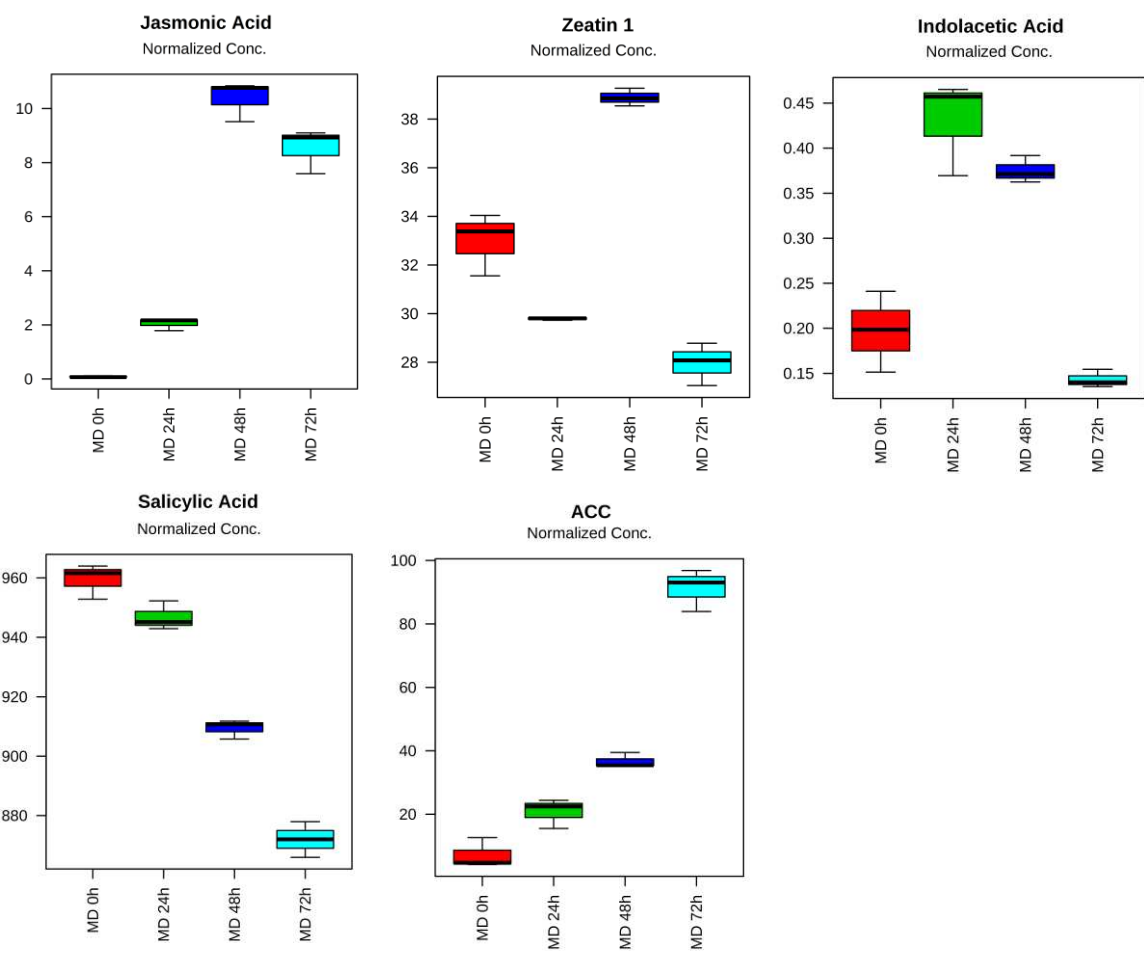


Figure 7: Phytohormones quantified by LC/MS from the elephant grass leaves injured by mechanical damages (DM) spectabilis different time of infestation. The data were analyzed by MetaboAnalist platform.

Overview of Pathway Analysis

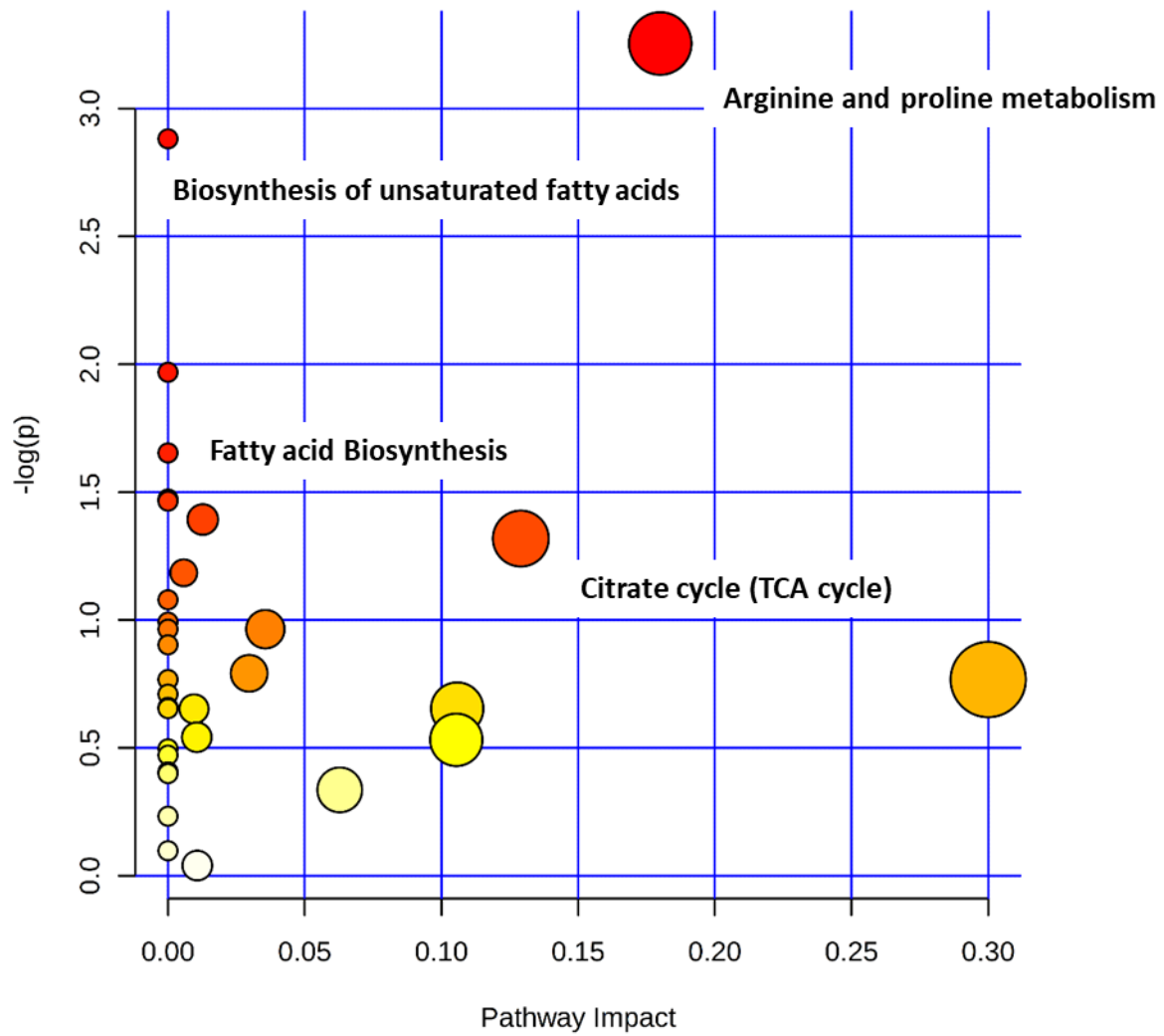


Figure 8: Pathway analysis performed by MetaboAnalyst platform of the identify metabolites by GC/MS from the salivary glands of *M. spectabilis*.

Table 1: Identified Metabolites in the salivary glands of *M. spectabilis*

Metabolite	Intensity*	Relative Abundance (%)
L-Isoleucine	836597	100
Carbamide	470054	56,18
Valine	389256	46,52
Octadecanoic acid	163492	19,54
Phosphoric acid	138803	16,59
Oleic acid	95197	11,37
Spermidine	60724	7,258
Prostaglandin A2	39534	4,725
Alanine	30275	3,618
Tetradecanoic acid	20395	2,437
Cadaverine	17651	2,109
Methyl tetracosanoate	15327	1,832064901
Methyl Palmitate	14013	1,6750000299
Hexadecanoic acid	14013	1,675
Heptadecanoic acid	13014	1,555
Carnosine	12277	1,467
Eicosanoic acid	12222	1,460
Vitamin K1	11278	1,348
Aphidicolin	9421	1,126
9-Octadecenoic acid	4601	0,549
Dodecanoic acid	4475	0,534
Citrulline	3434	0,410
Epicatechin	3006	0,359
Prostaglandin D2	2992	0,357
Heneicosanoic acid	2173	0,259
Salicylic Acid (AS)	3923,97**	-
Indolacetic Acid (AIA)	33,81**	-
Methyl Jasmonate (Me-JA)	58,17**	-

* Intensities of the ions from GC/MS spectrum in arbitrary units

** Concentration of the phytohormones in ng/g fresh glands determinate by LC/MS

REFERENCES

- Acevedo F.E., Rivera-Vega L.J., Chung S.H., Ray S., Felton G.W., 2015. Cues from chewing insects: the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 80–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.029>.
- Aljbory Z., A., Chen M.S., 2018. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Sci.* 25, 2-23. <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12436>.
- Auad, A.M., Simões A.D., Pereira A.V., Braga A.L.F., Sobrinho F.S., Lédo F.J.S., Paula-Moraes S. V., Oliveira S.A., Ferreira R.B., 2007. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 42, 1077-1081. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000800003>.
- Auad, A.M., Carvalho C.A., Clemente M.A., Prezoto F. 2010. Diversity of social wasps (Hymenoptera) in a silvipastoral system. *Sociobiology* 55, 627–636. <https://www.researchgate.net/publication/267748800>.
- Byers, R.A., Wells, H.D., 1966. Phytotoxemia of *Coastal bermudagrass* caused by the two-lined spittlebug *Prosapia bicincta* (Homoptera: Cercopidae). *Annals of the Entomological Society of America*, Columbus 59, 1067-1071. <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/59.6.1067>.
- Cuadros-Inostroza, A., Caldana, C., Redestig, H., Kusano, M., Lisec, J., Peña-Cortés, H., Willmitzer, L., Hannah, M. A., 2009. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics*, v.10, p. 428.
- Choi J., Tanaka K., Cao Y., Qi Y., Qiu J., Liang Y., Lee S.Y., Stacey G., 2014. Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science* 343, 290–294. <http://dx.doi.org/10.1126/science.343.6168.290>.
- Dervinis C., Frost C.J., Lawrence S.D., Novak N.G., Davis J.M., 2010. Cytokinin primes plant responses to wounding and reduces insect performance. *J. Plant Growth Regul.* 29, 289–296. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-009-9135-2>.

Dinh S.T., Gális I., Baldwin I.T., 2013. UVB radiation and 17-hydroxygeranylinalool diterpene glycosides provide durable resistance against mirid (*Tupiocoris notatus*) attack in field-grown *Nicotiana attenuata* plants. *Plant Cell Environ.* 36, 590–606. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02598.x>.

Erb M., Meldau S., Howe G.A., 2012. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci.* 17, 250–259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.003>.

Fonseca M.G., Auad A.M., Resende T.T., Hott M.C., Borges C.A.V., 2016. How will *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) respond to global warming? *J. Pest Sci.* 16,1–6. <http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/iew005>.

Gatehouse J.A., 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist* 156, 145–169. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x>.

Giron, D., Glevarec, G., 2014. Cytokinin-induced phenotypes in plant–insect interactions: learning from the bacterial world. *J. Chem. Ecol.* 40, 826–835. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-014-0466>.

Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C.M.J., Dicke, M., 2013. Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Funct. Ecol.* 27, 599–609. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.12042>.

Guiguet A., Dubreuil G., Harris M. O., Appel H.M., Schultz J.C., Pereira M.H., 2016. Shared weapons of blood- and plant-feeding insects: surprising commonalities for manipulating hosts. *J. Insect Physiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.006>.

Hansen, A.K., Moran, N.a., 2014. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Mol. Ecol.*, 23, 1473– 1496. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12421>.

Holmann F., Peck D.C., 2002. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: a first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. *Neotrop. Entomol.* 31, 275–284. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2002000200016>.

Howe G.A., Lightner J., Browse J., Ryan C.A., 1996. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8, 2067–2077. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.8.11.2067>.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Maffei, M.E., Mithöfer, A., Boland, W., 2007. Insects feeding on plants: rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry* 68, 2946–2959. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.016>.

Detoni de M.L., Faria-Pinto P; Quellis L.R, Rust N.M., Stephan L.T., Santos M. O., Isaias R.M.S., Santos J.C., Fernandes G.W., Soares G.L.G. Vasconcelos E.G., 2012. Galls from *Calliandra brevipes* BENTH (Fabaceae : Mimosoidae): evidence of apyrase activity contribution in a plant–insect interaction. *Australian Journal of Botany* 60, 559-567. <https://doi.org/10.1071/BT12096>.

Müller M., Munné-Bosch S., 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 18, 7-37. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-37>.

Nabity, P.D., Haus, M.J., Berenbaum, M.R., DeLucia, E.H., 2013. Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 110, 16663-8. . <https://doi.org/10.1073/pnas.1220219110>.

Faria-Pinto P., Meirelles M.N., Lenzi H.L., Mota E.M., Penido M.L., Coelho P.M., Vasconcelos E.G., 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. *Parasitology* 129, 51-7. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005244>.

Resende, T.T. Auad A.M., Fonseca M.G., Sobrinho F.S., Santos D. R., Silva S.E.B., 2013. The Damage Capacity of *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) Adults on *Brachiaria ruziziensis* Pasture. *Scientific World Journal* 2013; 2013:281295. <https://doi.org/10.1155/2013/281295>.

- Schäfer M., Meza-Canales I.D., Navarro-Quezada A., Brütting C., Vanková R., Baldwin I.T., Meldau S., 2015. Cytokinin levels and signaling respond to wounding and the perception of herbivore elicitors in *Nicotiana attenuata*. *J. Integr. Plant Biol.* 57, 198–212. <https://doi.org/10.1111/jipb.12227>.
- Schmelz E.A., LeClere S., Carroll M.J., Alborn H.T., Teal P.E., 2007. Cowpea chloroplastic ATP synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory. *Plant Physiol.* 144, 793–805. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097154>.
- Schmelz E.A., 2015. Impacts of insect oral secretions on defoliation-induced plant defense. *Curr. Opin. Insect Sci.* 9, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.002>.
- Schultz, J.C., Appel, H.M., 2004. Cross-kingdom cross-talk: hormones shared by plants and their insect herbivores. *Ecology* 85, 70–77. <https://doi.org/10.1890/02-0704>.
- Schwartzberg E.G., Tumlinson J.H., 2014. Aphid honeydew alters plant defence responses. *Funct. Ecol.* 28, 386–394. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12182>.
- Shinya T., Hojo Y., Desaki Y., Christeller J.T., Okada K., Shibuya N., Galis I., 2016. Modulation of plant defense responses to herbivores by simultaneous recognition of different herbivore-associated elicitors in rice. *Nature Scientific Reports* 6, 32537. <https://doi.org/10.1038/srep32537>.
- Stanley D., Miller J., Tunaz H., 2009. Eicosanoid Actions in Insect Immunity. *J. Innate. Immun.* 1, 282-290. <https://doi.org/10.1159/000210371>.
- Stanley D., 2006. The non-venom insect phospholipases A₂. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1383–1390. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.05.011>.
- Stanley D., Kim Y., 2014. Eicosanoid signaling in insects: from discovery to plant protection. *Crit Rev. Plant Sci.* 33, 20–63. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.847631>.
- Stutzer, C., Mans, B.J., Gaspar, A.R.M., Neitz, A.W.H., Maritz-Olivier, C., 2009. *Ornithodoros*

- savignyi: soft tick apyrase belongs to the 50-nucleotidase family. *Exp. Parasitol.* 122, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.007>.
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., Stacey, G., 2014. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front. Plant Sci.* 3, 5-446 [10.3389/fpls.2014.00446](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00446).
- Taussky H.M., Shorr E., 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202, 675-685. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.12.20>.
- Van Doorn A., de Vos M., 2013. Resistance to sap-sucking insects in modern-day agriculture. *Front Plant Sci.* 4, 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00222>.
- Walley J.W., Shen Z., Sartor R., Wu K.J., Osborn J., Smith L.G., Briggs S.P., 2013. Reconstruction of protein networks from an atlas of maize seed proteotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E4808–E4817. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319113110>.
- Wu S., Peiffer M., Luthe D.S., Felton G.W., 2012. ATP hydrolyzing salivary enzymes of caterpillars suppress plant defenses. *PLoS ONE* 7, e41947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041947>.
- Zebelo, S.A., Maffei, M.E., 2012. The Ventral Eversible Gland (VEG) of *Spodoptera littoralis* triggers early responses to herbivory in *Arabidopsis thaliana*. *Arthropod Plant Interact.* 6, 543–551. <https://doi.org/10.1007/s11829-012-9200-9>.
- Zebelo, S.A., Maffei, M.E., 2015. Role of early signalling events in plant–insect interactions. *J. Exp. Bot.* 66, 435–448. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru480>.
- Zhang X., Jiang S., Mitok K.A., Li L., Attie A.D., Martin T.F.J., 2017. BAIAP3, a C2 domain-containing Munc13 protein, controls the fate of dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1083/jcb.201702099>.
- Zimmermann H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 44–56. <https://doi.org/10.1002/ddr.1097>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1: Transition list of the ions monitored for quantification analysis of the phytohormones from *Pennisetum purpureum* leaves by MRM. The scan mode, the mass of the molecular ion and of respective fragment ions are indicated.

PHYTOHORMONES	MS1	MS2	SCAN MODE
Zeatin	220	202	Positive
ACC	106	56	Positive
Auxin	176	130	Positive
ABA	263	153	Negative
Salicylic acid	137	93	Negative
MeJa	225	151	Negative
Jasmonic acid	209	59	Negative