

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LUANA PEREIRA MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INTERAÇÃO DA CIGARRINHA-
DAS-PASTAGENS (*Mahanarva spectabilis*) COM DIFERENTES
FORRAGEIRAS**

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2019

LUANA PEREIRA MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INTERAÇÃO DA CIGARRINHA-
DAS-PASTAGENS (*Mahanarva spectabilis*) COM DIFERENTES
FORRAGEIRAS**

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*

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira

Coorientadores: Alexander Machado Auad
Camilo Elber Vital
Humberto Josué de O. Ramos
Jorge Fernando Pereira

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2019

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

T

M775c
2019 Monteiro, Luana Pereira, 1981-
Caracterização molecular da interação da
cigarrinha-das-pastagens (*Mahanarva spectabilis*) com
diferentes forrageiras / Luana Pereira Monteiro. – Vicososa, MG,
2019.

xi, 80f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Mahanarva spectabilis*. 2. Glândulas salivares.
3. Proteômica. 4. Relação inseto-planta. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 595.75

LUANA PEREIRA MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INTERAÇÃO DA CIGARRINHA-
DAS-PASTAGENS (*Mahanarva spectabilis*) COM DIFERENTES
FORRAGEIRAS**

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: 30 de julho de 2019.

Dr^a Gláucia Cordeiro
(UFV)

Dr. Jorge Fernando Pereira
(EMBRAPA)

Prof^a Adriana Maria Patarroyo Vargas
(UNIVIÇOSA)

Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)
(UFV)

Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientador)
(UFV)

Aos meus pais Faustino e Maria Aparecida por sempre me conduzirem no caminho do bem e da verdade.... Por sonharem os meus sonhos. Meu porto seguro, minha paz, certeza de amor, proteção e carinho.

À José Damasceno Pereira (*in memoriam*) exemplo de simplicidade, conduta, incentivo e sabedoria. Amor na sua essência mais pura, mais sincera. És a minha saudade diária. A certeza da sua presença sempre foi e para sempre será meu amparo, meu alicerce nos momentos de alegria e de dificuldades.... Sei que está muito orgulhoso e feliz pela sua menina!!!

Dedico

À Rafaela Zandonade Ventorim, por sempre ser tão presente e essencial nessa linda jornada da vida.... Minha irmã de alma, parceria forte e certa, a quem dedico minha amizade e lealdade.

À Verônica Aparecida Faustino, sempre serei grata por ter podido compartilhar da sua amizade, do convívio com a pessoa de coração mais puro que já conheci...

À Camilo Elber Vital, por tantos valores que pude aprender com você, sem dúvida os que nunca serão esquecidos por mim são a lealdade, e o valor de uma verdadeira amizade.

Dedico e Ofereço

“ Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. **O essencial é invisível aos olhos.** Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer. **Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.**”

Antoine de Saint-Exupéry

“Abençoados aqueles que se preocupam conosco, que nos amam, que nos atendem as necessidades... Valorizemos o amigo que nos socorre, que se interessa por nós, que nos escreve, que nos telefona para saber como estamos indo... **A amizade é uma dádiva de Deus.** Mais tarde, haveremos de sentir falta daqueles que não nos deixam experimentar a solidão.”

Chico Xavier

Primeiramente agradeço à Deus, pelo dom da vida, por ter me concedido determinação e força para que pudesse vencer mais essa etapa, não me desamparando jamais, mesmo em momentos de desespero a fé e a certeza de que tudo está sob Seus cuidados me fortaleceram.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. Nem mesmo a Lei de Murphy me impediu de sonhar e seguir. A resiliência nos capacita a reinventar nas situações de crise e a Fé em Deus a seguir o nosso caminho.

Aos meu pais, razão de todo meu empenho e esforço, por sempre fazerem dos meus sonhos os seus, por tornar tudo mais leve com cada abraço de carinho e consolo, por sempre me incentivarem a seguir em frente, a não desistir jamais dos meus ideais. Por tanto amor e dedicação despendidos a mim,

Aos meu familiares por sempre me apoiarem e entenderem minha ausência em momentos tão importantes. Em especial agradeço a Mãe Luzia, minha amiga, companheira, confidente.... Com sua maneira única e peculiar de ser, torna tudo muito mais alegre e especial. Suas orações sempre me guiaram e sei o quanto está feliz e orgulhosa por mais essa etapa conquistada na minha vida. Sem seu apoio, amor e dedicação tudo seria mais difícil. Obrigada por tudo minha bonequinha...

Aos meu sobrinhos Carlos Eduardo, Mateus e Laís, que me ensinaram o significado de um amor puro e incondicional. Obrigada pela grandeza de sentir algo tão especial!

À Eduardo Pereira Monteiro, para mim simplesmente Tio Du, pelo apoio, carinho, e amor de sempre....

Ao Fabrício, que por inúmeras vezes foi acalento e amparo, fosse com suas palavras de paz e sabedoria ou com seu abraço acolhedor e afetuoso. Serei sempre grata por tudo que fez por mim, por tanto que me ajudou e principalmente por tudo que me ensinou e me ensina, muitas vezes até sem saber.

À Rafaela, presente mais valioso que ganhei na vida, somos tão diferentes e impressionantemente tão parecidas que chega a dar medo. Jamais poderei te agradecer por tudo

que você fez (e sei que ainda fará) por mim. Cada puxão de orelha, cada conselho, cada abraço, cada riso, cada vez que secou minhas lágrimas.... Chegar até aqui foi difícil, mas com sua ajuda tudo ficou mais fácil e muito mais feliz... foram tantas cervejas compartilhadas, tantas viagens, tantos momentos que jamais iremos esquecer. Obrigada por ser você, e mais ainda obrigada por existir na minha vida. Não poderia deixar de agradecer à sua família, que agora é um pouco minha também... pelo carinho com que sempre me recebem...a verdade é que eu me sinto em casa na sua casa...

À Aline Sales, minha amiga tão querida e especial. Você e meu pequeno anjo Gabriel são pessoas essenciais na minha vida, com quem tenho o privilégio de conviver e aprender muito a cada dia. Ter a certeza de sua amizade e saber que posso contar sempre com você faz toda a diferença para mim!! Amo vocês...

À Verônica, dona dos sorrisos mais fáceis e sinceros que já vi, que faz dos nossos cafés na 'salinha de estudo' muito mais animados. Que felicidade sinto de ser sua amiga, de poder compartilhar momentos tão especiais com você. Você sempre diz que aprende muito comigo, mas na verdade sou eu quem aprendo muito com você.

Aos amigos Ronaldo e Gabriela, amizade que começou tímida, mas que logo tomou grandes proporções e hoje é um dos grandes valores que carrego em meu coração. Meus amigos, que por tanto passamos, que tanto aprendemos, tenho a certeza do quanto somos importantes e especiais uns para os outros, e só tenho a te agradecer por vocês serem sempre tão carinhosos e atenciosos comigo.

À Dalila, tão atenciosa e disposta a ajudar...Obrigada por suas palavras de incentivo e afeto. À Patrícia Fontes, amiga tão querida, suas palavras sempre me fortalecendo. Admiro muito sua força e sua determinação...

Aos amigos Jenny e Juan Diego agradeço por toda ajuda no laboratório, por cada ensinamento, mas principalmente pela oportunidade de convivência sempre tão tranquila e especial.

Ao Antônio, certeza de que tudo tem hora certa para ser e acontecer. Não é capaz de imaginar o tamanho da minha alegria em ter podido estar mais próximo de você, e espero que assim permaneça, afinal temos algumas cervejas para partilhar.

Ao Camilo agradeço de todo meu coração por tudo que você foi capaz de me ensinar. Sua dedicação científica na elaboração desse trabalho foi primordial, essencial. Não tenho dúvidas que sem ela não teria chegado até aqui. Aprendi muito mais do que você possa imaginar com seu convívio, e por isso sou muito grata a você.

À vocês todo meu amor, respeito e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, instituição exemplo de pesquisa e ensino,

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de realização do curso,

A professora Maria Goreti de Almeida Oliveira pela orientação, dedicação, apoio e conhecimentos transmitidos,

Ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos, pelos ensinamentos, exemplo de dedicação e competência na pesquisa,

Ao Dr Camilo Elber Vital pela enorme contribuição científica dedicada a esse trabalho, e pela disposição que sempre teve em colaborar na condução do experimento, e na execução da escrita desse trabalho,

Aos colegas do laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos pela excelente convivência e companheirismo. Pela oportunidade de troca de conhecimento e aprendizado,

As agências de fomento Fapemig, Capes e CNPq pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto,

À Embrapa Gado de Leite por disponibilizar material biológico para condução da pesquisa. Em especial agradeço aos pesquisadores Alexander Machado Auad e Jorge Fernando Pereira pela co-orientação, dedicação, contribuição científica e disposição em ajudar para que conseguíssemos concluir o trabalho com êxito. Deixo meus sinceros agradecimentos a vocês. Agradeço também a Marcele e ao Thiago por contribuir sempre tão gentilmente com a condução do trabalho,

À toda equipe do Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL), pela paciência e grandiosa ajuda nas análises e softwares, em especial ao Edvaldo Barros, meus sinceros agradecimentos por toda a sua disponibilidade em ajudar e ensinar.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e aceite na participação na conclusão desse trabalho.

Agradeço

Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.

Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para a frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo.

Crê e trabalha.

Esforça-te no bem e espera com paciência. Tudo passa e tudo

se renova na Terra, mas o que vem do céu permanecerá.

De todos os infelizes, os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmos, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo.

Eleva, pois, o teu olhar e caminha.

Luta e serve. Aprende e adianta-

te. Brilha a alvorada além da

noite.

Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte...

Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.

“Cartas do Coração” – Francisco Cândido Xavier

RESUMO

MONTEIRO, Luana Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Caracterização molecular da interação das cigarrinhas-das-pastagens (*Mahanarva spectabilis*) com diferentes forrageiras.** Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Camilo Elber Vital, Alexander Machado Auad, Jorge Fernando Pereira.

A cigarrinha-das-pastagens, *Mahanarva spectabilis* (Distant,1909) é a principal praga em forrageiras na América Tropical, promovendo danos severos às pastagens, e comprometendo a produção de produtos de origem animal. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, e para garantir baixos custos na produção, usa as pastagens como a principal fonte de alimentação do rebanho. Em decorrência de ataques de insetos- praga, o nível de produtividade das pastagens pode sofrer declínio tanto na quantidade quanto na qualidade de produção. A seleção de cultivares de forrageiras resistentes, é uma alternativa de controle promissora, uma vez que o controle químico das cigarrinhas é economicamente inviável. São escassos os trabalhos que relatam a bioquímica da interação entre *M. spectabilis* com diferentes forrageiras. O objetivo, na primeira parte do trabalho, foi identificar as proteínas, metabólitos e hormônios presentes nas glândulas salivares quando a *M. spectabilis* se alimenta de plantas de capim-elefante (*Cenchrus purpureus*), cv. Roxo Botucatu e cv. Pioneiro, *Brachiaria brizantha* cv. Marandú e *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk. Na segunda parte, objetivamos elucidar as possíveis respostas metabólicas nas forrageiras *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) cv. Roxo-de-Botucatu e cv. Pioneiro quando infestadas por *M. spectabilis*. Através das análises de proteômica foi possível identificar proteínas envolvidas em processos como controle da musculatura, síntese e metabolismo protéico, proteção contra estresse biótico/abiótico e termoregulação. As análises fitohormonais das glândulas salivares indicam uma variação nos níveis hormonais em função do tipo de forrageira usada na alimentação. Foram detectados nos componentes das glândulas salivares a presença de efetores, tais como ácidos graxos de cadeia longa que podem induzir ou suprimir as respostas de defesa das plantas. A presença dos efetores afetam as respostas de defesa da planta para permitir o melhor desempenho do inseto na infestação das plantas. De frente a esses resultados, nos é permitido propor que alguns efetores presentes nas glândulas salivares de cigarrinha das pastagens possam ser responsáveis por suprimir a resposta de defesa da planta, tornando-se uma estratégia bem sucedida do inseto na colonização do hospedeiro.

Palavras-chave: Cigarrinha-das-pastagens. Glândula salivar. Proteômica. Interação planta-praga.

ABSTRACT

MONTEIRO, Luana Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Molecular characterization of the interaction of spittlebugs (*Mahanarva spectabilis*) with different forages.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-adviser: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Camilo Elber Vital, Alexander Machado Auad, Jorge Fernando Pereira.

The spittlebugs, *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) is the main forage pest in Tropical America, causing severe damage to pastures and compromising the production of animal products. Brazil has the largest commercial herd in the world, and to ensure low production costs, it uses pasture as its primary feed source. As a result of insect pest attacks, pasture productivity may decline in both quantity and quality of production. Selection of resistant forage cultivars is a promising control alternative, since chemical control of leafhoppers is economically unfeasible. There are few studies reporting the biochemistry of the interaction between *M. spectabilis* with different forages. The objective, in the first part of the work, was to identify the proteins, metabolites and hormones present in the salivary glands when *M. spectabilis* feeds on elephant grass (*Cenchrus purpureus*), cv. Purple Botucatu and cv. Pioneer, Brachiaria brizantha cv. Marandú and Brachiaria decumbens cv. Basilisk In the second part, we aim to elucidate the possible metabolic responses in the forages Brachiaria brizantha, Brachiaria decumbens, elephant grass (*Cenchrus purpureus*) cv.

Botucatu purple and cv. Pioneer when infested by *M. spectabilis*. Through proteomics analyzes it was possible to identify proteins involved in processes such as muscle control, protein synthesis and metabolism, protection against biotic / abiotic stress and thermoregulation. Phytohormonal analyzes of salivary glands indicate a variation in hormone levels depending on the type of forage used in the diet. The presence of effectors such as long chain fatty acids that can induce or suppress plant defense responses has been detected in salivary gland components. The presence of effectors affects plant defense responses to allow the best insect performance in plant infestation. Given these results, we are allowed to propose that some effectors present in the leafhopper salivary glands of the pastures may be responsible for suppressing the defense response of the plant, becoming a successful insect strategy in host colonization.

Keywords: Spittlebugs. Salivary gland. Proteomics. Plant-pest interaction.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	<u>1</u>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<u>5</u>
<i>CAPÍTULO I</i>	<u>9</u>
PERFIL PROTEICO E FITOHORMONAL DE GLÂNDULAS SALIVARES DE <i>MAHANARVA SPECTABILIS</i> INFESTANDO DIFERENTES FORRAGEIRAS	<u>9</u>
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS PLANTAS	13
2.2. INFESTAÇÃO DAS PLANTAS E EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS	13
2.3. PROTEÔMICA	14
2.3.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS	14
2.3.2. ELETROFORESE MONODIMENSIONAL	14
2.3.3. HIDRÓLISE TRIPTICA	14
2.3.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)	15
2.3.5. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	16
2.3.6. CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS	16
2.4. QUANTIFICAÇÃO DE FITOHORMONIOS	17
2.4.1. EXTRAÇÃO	17
2.4.2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	17
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
3. RESULTADOS	19
3.1 PROTEÔMICA	19
3.1.1 AGRUPAMENTO DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM GLÂNDULAS SALIVARES DE <i>M. SPECTABILIS</i>	19
3.1.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS IDENTIFICADOS EM GLÂNDULAS SALIVARES DE <i>M. SPECTABILIS</i>	20
3.1.3 PROCESSOS BIOLÓGICOS EXCLUSIVOS EM GLÂNDULAS SALIVARES DE <i>M.SPECTABILIS</i>	22
3.2 FITORMÔNIOS IDENTIFICADOS EM GLÂNDULAS SALIVARES DE <i>M.SPECTABILIS</i>	26
4. DISCUSSÃO	28
4.1.PROCESSOS BIOLÓGICOS IDENTIFICADOS EM GLÂNDULA SALIVAR DE <i>M. SPECTABILIS</i>	28
4.2.PROCESSOS BIOLÓGICOS EXCLUSIVOS EM GLÂNDULA SALIVAR DE <i>M.SPECTABILIS</i>	30
4.3 PERFIL HORMONAL DE GLÂNDULAS SALIVARES DE <i>M. SPECTABILIS</i>	36
5. CONCLUSÃO	40
6. AGRADECIMENTOS	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

<i>CAPÍTULO II</i>	51
RESPOSTAS METABÓLICAS EM FORRAGEIRAS INFESTADAS POR <i>MAHANARVA SPECTABILIS</i>	51
RESUMO	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 OBTENÇÃO DAS PLANTAS	56
2.2 INFESTAÇÃO COM <i>MAHANARVA SPECTABILIS</i>	56
2.3 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS E DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA PARA ANÁLISES POR LC/MS	56
2.4 ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO	57
2.5 PROCESSAMENTO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS	57
3. RESULTADOS	59
4. DISCUSSÃO	74
5. 5. CONCLUSÃO	76
6. AGRADECIMENTOS	76
7. REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária, atividade pertencente ao setor primário da economia, é uma das principais áreas em termos de produção de riqueza no país, além de ser de fundamental importância para a humanidade uma vez que utiliza a criação e reprodução dos animais para fins econômicos e para consumo. No ano de 2018, de acordo com a ABIA (Associação Brasileira da Indústria de Alimentos) os produtos derivados de carne geraram um faturamento de R\$ 145,00 bilhões, ao passo que os laticínios geraram um faturamento de R\$ 69,00 bilhões. A atividade está cada vez mais interligada ao meio industrial e mais dependente das transformações nas técnicas e nos recursos tecnológicos (Dias-Filho 2015; Carvalho & Zen, 2017).

As condições de clima e a extensão territorial são peculiaridades que, desde os primórdios da pecuária brasileira, definem uma característica importante dessa atividade: ter a quase totalidade do rebanho criado em pastagens aliado ao custo mais baixo da produção forrageira (Ferraz; Felício, 2010). Em decorrência dessa vocação da pecuária nacional, o Brasil tem nas pastagens o fundamento da sua pecuária, garantindo com isso um dos menores custos de produção de carne e leite bovina do mundo (Carvalho et al., 2009; Deblitz, 2013; Ferraz; Felício, 2010).

Embora as pastagens constituam a base da alimentação dos rebanhos na bovinocultura nacional, insetos-praga em áreas sob pastejo apenas despertam interesse quando da constatação de altas infestações e danos evidentes. Isso é explicado tendo em vista que as pastagens são consideradas culturas de baixo valor por unidade de área, onde raramente são adotadas medidas curativas de controle (Valério et al., 2013).

Apesar dos danos causados por insetos-praga na produção da forrageira serem, em muitos casos, evidentes, são raros os dados sobre o impacto deles na produção animal (Costa et al., 2008). Como mencionado por Pottinger, 1976, enquanto as perdas, ocasionadas por insetos em culturas anuais, são relativamente fáceis de estimar (por causa do efeito direto na colheita), a avaliação do dano de insetos em pastagens, em termos de produção animal, é complexa, onerosa e difícil.

Dentre as pragas comumente referidas como de maior importância em gramíneas forrageiras na bovinocultura nacional, o destaque tem sido dado às cigarrinhas-das pastagens. 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; Alvarenga et al., 2019). Esses insetos têm merecido maior atenção, em face dos altos níveis populacionais, das ocorrências generalizadas e da severidade dos danos que causam.

O início da infestação das cigarrinhas coincide com a estação chuvosa do ano, justamente quando as forrageiras estão em franco crescimento e os animais, recuperando-se do período seco anterior, ganhando peso e adquirindo condições para a reprodução e o abate (Valério, 2009).

As fases de desenvolvimento das cigarrinhas que causam danos para as plantas são as ninfas (fase jovem) e os adultos. As ninfas ficam alojadas na superfície do solo, na base das plantas, sendo protegidas por uma espuma branca, de produção característica da espécie, e seu ciclo de vida dura em torno de 40 dias. Sugam constantemente a seiva promovendo o amarelamento das plantas (Valério, 2013). Já os insetos adultos possuem um ciclo de vida que dura em torno de 10 a 15 dias, 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 alterações de ordem fisiológica como a diminuição na capacidade fotossintética que leva a redução da produção de massa seca e na qualidade da forragem (Aguiar et al., 2014; Resende, 2014), tornando-as impalatáveis para o gado e limitando a produtividade de pastagem (Byers & Wells, 1966; Resende et al., 2013).

O comprometimento das pastagens, anualmente atacadas por esses insetos, tem constituído um problema relevante dentro da bovinocultura nacional (Silva, 2017). Tais impactos conferem a esse inseto um destaque frente à cultura das forrageiras e, conseqüentemente, torna-se um gargalo para a produção extensiva de gado no Brasil (Alvarenga et al., 2019).

Da produção total de sementes das principais forragens tropicais, as sementes de *Brachiaria* ssp representam 83,8% da produção total, enquanto sementes de *P. maximum* representam 13,5% da produção. Esses dados demonstram que grande parte da receita do setor vem da comercialização de sementes desses dois gêneros (Jank et al., 2014). Não há dados estatísticos referentes a área coberta por cada espécie de pasto no Brasil. Nogueira (2012) disponibilizou dados de uma pesquisa feita por consultoria particular, na qual descreve que cerca 68,2% da área de pastagem é coberto por cultivares de *B. brizantha*, 9,1% por outras espécies *Brachiaria* (*B. decumbens*, *ruziziensis* e *humidicola*), 10,2% em *P. maximum*, 5,8% por *Andropogon gayanus*, 5,8% por outras espécies e 0,8% por pastagens nativas.

Nunes e Camargo-Mathias, 2001, descrevem estudos sobre a morfologia, histologia e histoquímica das glândulas salivares de *Mahanarva fimbriolata*, revelando que são estruturas lobulares, pareadas localizadas em cada lado da cabeça. Dois ductos são projetados a partir dessas glândulas, fundem-se centralmente para formar um ducto comum que leva a secreção em direção às partes bucais do inseto, e então para o exterior.

As diferenças existentes entre cada um dos lóbulos em relação à morfologia e histoquímica, foi descrita por Nunes et al. (2006), indicando que cada região glandular produz um tipo diferente de secreção. Vandermoten et al. (2014) reforçam esta informação em estudos com secreções salivares em espécies de pulgão.

A presença de proteases, glucose oxidase, amilase, lipase, surfactantes, hormônios e metabólitos já foi descrita em glândulas salivares de insetos como lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) (Acevedo et al., 2017), barbeiro (*Blissus occiduus*) (Ramm et al., 2015), traças (*Spodoptera exigua*) (Afshar et al., 2013) e bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (Hou et al., 2007). Vale salientar a importância dessa informação uma vez que é crescente o interesse na função desempenhada pela secreção salivar dos insetos frente a interação com as plantas hospedeiras.

No decorrer do processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa frente a ação da secreção oral dos herbívoros (efetores), por meio de sinais de reconhecimento que podem ser utilizados para mediar defesas induzidas (elicitores) (Nabity et al., 2013; Giron & Glevarac, 2014; Saraiva, 2018).

Quando os herbívoros iniciam a alimentação em uma planta, eles apresentam 'indícios' à planta para que ela possa perceber e mobilizar rapidamente as resposta de defesas induzidas (Tooker et al., 2010). Em geral, esses "indícios" provocam uma resposta de defesa, mas também levam a questões sobre como os herbívoros podem escapar da resposta de defesa da planta, ou ainda se alguns herbívoros são capazes de ejetar efetores que permitam a evasão no hospedeiro (Weech et al., 2008).

Estudos de contra-defesas por herbívoros já foram feitos por De Moraes & Mescher, 2004; Zhu-Salzman et al., 2005; Oppel et al., 2009, porém uma menor atenção se concentrou em como os herbívoros podem interferir, induzir ou escapar das defesas induzidas pelas plantas (Karban & Agrawal, 2002; Walling, 2009; Bos et al., 2010).

De acordo com Felton et al. (2014), existem relatos acerca de efetores de herbívoros derivados de secreção salivar, porém ainda seus mecanismos funcionais e fisiológicos permanecem pouco esclarecidos. Moléculas secretadas pelo inseto-praga são reconhecidos pelas plantas e derivam em uma resposta defensiva.

Compreender os mecanismos de resistência dos insetos às respostas de defesa das plantas é fundamental para o desenvolvimento de novos genótipos mais resistentes por engenharia genética (VanDoorn e De Vos 2013).

Neste contexto, os compostos presentes na secreção oral de herbívoros desempenham um papel importante não só na interação entre a modulação planta-inseto, mas também nas vias de sinalização de defesa da planta (Rivera-Veja et al., 2018).

A complexidade de constituintes da secreção salivar dos insetos, tem tornado importante o seu estudo. Para tanto, o uso de ferramentas como análises proteômica e metabolômica mostra-se como um relevante aliado afim de elucidar o entendimento global e integrado dos processos biológicos, permitindo a compreensão dinâmica do metabolismo através da análise sistemática de proteínas e metabólitos expressos pelo genoma (Rivera-Veja et al., 2017a). Cabe ressaltar que essas análises buscam a compreensão do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas.

Diante do exposto, na primeira parte do trabalho objetivamos traçar o perfil proteico e fitohormonal das glândulas salivares de *M. spectabilis* quando estas infestam diferentes forrageiras. Na segunda parte objetivamos evidenciar as respostas metabólicas nas forrageiras *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) cv. Roxo-de-Botucatu e cv. Pioneiro quando infestadas por *M. spectabilis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, F.E., STANLEY, B.A., STANLEY, A., PEIFFER, M., LUTHE, D.S., FELTON, G.W. **Quantitative proteomic analysis of the fall armyworm saliva.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 86, 81–92. doi:10.1016/J.IBMB.2017.06.001. 2017.
- ABIA (Associação Brasileira da Indústria de Alimentos). <https://www.abia.org.br/vsn/>. Acesso em Julho, 2019.
- AFSHAR, K., DUBE, F.F., NAJAFABADI, H.S., BONNEIL, E., THIBAUT, P., SALAVATI, R., BEDE, J.C., **Insights into the insect salivary gland proteome: diet-associated changes in caterpillar labial salivary proteins.** *J. Insect Physiol.* 59, 351– 66. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.01.002 ,2013.
- AGUIAR D.M., AUAD, A.M., FONSECA, M.G.; LEITE M.V, **Brachiaria ruziensiensis responses to different fertilization do see sand to the attack of Mahanarva spectabilis (Hemiptera: Cercopidae) nymphs and adults.** *Sci WorldJ* 2014:1–8, 2014.
- ALVARENGA, R., AUAD, A. M., MORAES, J. C., DA SILVA, S. E., RODRIGUES, B. S. **Tolerance to nymphs and adults of Mahanarva spectabilis (Hemiptera: Cercopidae) by forage plants in fertilized soils.** *Pest. Manag. Sci.* doi:10.1002/ps.5361, 2019.
- AUAD, A.M., CARVALHO, C.A., CLEMENTE, M.A., PREZOTO, F. **Diversity of social wasps (Hymenoptera) in a silvipastoral system.** *Sociobiology* v 55, p. 627–636, 2010.
- BOS J.I, PRINCE D, PITINO M, MAFFEI M.E, WIN J, HOGENHOUT S.A: **A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species Myzus persicae (Green Peach Aphid).** *PLoS Genet*, 6:e1001216, 2010.
- BYERS, R.A., WELLS, H.D. **Phytotoxemia of Coastal bermudagrass caused by the twolined spittlebug Prosapia bicincta (Homoptera: Cercopidae).** *Annals of the Entomological Society of America*, Columbus, v 59, p. 1067-1071, 1966.
- CARVALHO, T. B. DE; ZEN, S. DE; TAVARES, E.C.N. **Comparação de custo de produção na atividade de pecuária de engorda nos principais países produtores de carne bovina.** In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47. 2009, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SOBER, Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/356.pdf>, 2009.
- CARVALHO, T.B., ZEN, S. **A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências.** *Revista iPecege*, v 3, p. 85-99, 2017.
- COSTA, C., MEIRELLES, P.R.L., SILVA, J. J., FACTORI, M.A. **Evolução das pastagens e do efeito bovino no Brasil.** *Veterinária e Zootecnia*, v. 15, p. 8-17, 2008
- DEBLITZ, C. **Beef and Sheep Report: understanding agriculture worldwide.** Agri benchmark. Disponível em: <http://www.agribenchmark.de/beef-and-sheep/publicationsand-projects/beef-and-sheep-report.html>, 2013.

DE MORAES, C.M. & MESCHER, M.C. **Biochemical crypsis in the avoidance of natural enemies by an insect herbivore.** Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 101, 8993–8997, 2004.

DIAS-FILHO, M.B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 36 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 402). Disponível em: <http://bit.ly/1v0USg3>, 2014.

FELTON, G.W., CHUNG, S.H., HERNANDEZ, M.G.E., LOUIS, J., PEIFFER, M., & TIAN, D. **Herbivore Oral Secretions are the First Line of Protection Against Plant-Induced Defences.** Annual Plant Reviews, 37–76. doi:10.1002/9781118829783.ch2, 2014.

FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E. DE. **Production systems - An example from Brazil.** Meat Science, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

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.

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.

GATEHOUSE J.A., **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>, 2002.

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.

HOU, Y., XIA, Q., ZHAO, P., ZOU, Y., LIU, H., GUAN, J., GONG, J., XIANG, Z., **Studies on middle and posterior silk glands of silkworm (*Bombyx mori*) using twodimensional electrophoresis and mass spectrometry.** Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 486–496. doi:10.1016/j.ibmb.2007.02.011, 2007.

JANK, LIANA & BARRIOS, SANZIO & VALLE, CACILDA & SIMEÃO, ROSANGELA & ALVES, GEOVANI, **The value of improved pastures to Brazilian beef production.** Crop and Pasture Science. 65. 1132-1137. 10.1071/CP13319, 2014.

KARBAN, R. & AGRAWAL, A.A. **Herbivore offense.** Annual Review of Ecology and Systematics. 33, 641–664, 2002.

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.

NOGUEIRA MP. **Rally da Pecuária faz diagnóstico de nossas pastagens.** Balde Branco. pp. 43–45, 2012.

NUNES, P.H., CAMARGO-MATHIAS, M.I., **Glândulas salivares da cigarrinha-da-cana *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854)**, Estudo Morfo-Histológico e Dosagem de Proteínas, 18 e 28 relatórios da FAPESP. Bolsa de Iniciação Científica, processo nº 00/08355-2 2001, 2001.

NUNES, P.H., & CAMARGO-MATHIAS, M.I. **Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Euhemiptera: Cercopidae)**. *Micron* 37(1), 57–66. doi:10.1016/j.micron.2005.06.005, 2006.

OPPEL, C.B., DUSSOURD, D.E. & GARIMELLA, U. **Visualizing a plant defense and insect counterploit: Alkaloid distribution in *Lobelia* leaves trenched by a Plusiine caterpillar**. *Journal of Chemical Ecology*. 35, 625–634, 2009.

POTTINGER, R.P. **The importance of pasture pests in animal production**. *Proceedings New Zealand Society Animal Production*. v. 36, p.12-22, 1976.

RAMM, C., WAYADANDE, A., BAIRD, L., NANDAKUMAR, R., MADAYIPUTHIYA, N., AMUNDSEN, K., HENG-MOSS, T. **Morphology and Proteome Characterization of the Salivary Glands of the Western Chinch Bug (Hemiptera: Blissidae)**. *Journal of Economic Entomology*, 108(4), 2055–2064. doi:10.1093/jee/tov149, 2015.

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.

RESENDE, TT, AUAD, A.M AND FONSECA M.G, **How many adults of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) should be used for screening *Brachiaria ruziziensis* (Poales: Poaceae) resistance?** *JEconEntomol* 107:396–402, 2014.

RIVERA-VEJA, L.J., ACEVEDO, F.E., FELTON, G.W., **Genomic of *Lepidoptera* saliva reveals function in herbivory**. *Curr. Opin. Insect Sci.* 19, 61-69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.01.002>, 2017.

RIVERA-VEGA, L.J., STANLEY, B.A., STANLEY, A., & FELTON, G.W. **Proteomic Analysis of labial saliva of the generalist cabbage looper (*Trichoplusia ni*) and its role in Interactions with host plants**. *Journal of Insect Physiology*, 107, 97–103. doi:10.1016/j.jinsphys.2018.03.001, 2018.

SARAIVA, N.B, **Interação cigarrinha-das-pastagens (*Mahanarva spectabilis*) e capimelefante: análise proteômica dos ovos e efetores em glândulas salivares**. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p.58. 2018.

SILVA S.E.B, AUAD A.M, MORAES J.C, ALVARENGA R, CLAUDINO S.S;
RESENDE TT, **Biological performance and preference of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) for feeding on different forage plants**. *J Econ Entomol* 110:1877-1885 ,2017.

TOOKER, J.F., PEIFFER, M., LUTHE, D.S. & FELTON, G.W. **Trichomes as sensors: Detecting activity on the leaf surface**. *Plant Signaling and Behavior* 5, 73–75, 2010.

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

- VALÉRIO J.R, Manejo de insetos-praga, pp. 317-331. In R.A. Reis, T.F. Bernardes and G.R. Siqueira (eds.), **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Multipress, 2013.
- VAN DOORN A., DE VOS M., **Resistance to sap-sucking insects in modern-day agriculture**. Front Plant Sci. 4, 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00222>, 2013.
- VANDERMOTEN, S., N. HARMEL, G. MAZZUCHELLI, E. DE PAUW, E. HAUBRUGE, AND F. FRANCIS. **Comparative analyses of salivary proteins from three aphid species**. Insect Mol. Biol. 23: 67–77, 2014.
- WALLING, L.L. **Adaptive defense responses to pathogens and insects**. Advances in Botanical Research 51, 551–612, 2009.
- WEECH, M.H., CHAPLEAU, M., PAN, L., I.D.E, C.; BEDE, J.C. **Caterpillar saliva interferes with induced Arabidopsis thaliana defence responses via the systemic acquired resistance pathway**. Journal of Experimental Botany 59, 2437–2448, 2008.
- ZHU-SALZMAN, K., BI, J.L., LIU, T.X. **Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense**. Insect Science 12, 3–15, 2005.

Capítulo I

Perfil proteico e fitohormonal de glândulas salivares de *Mahanarva spectabilis* infestando diferentes forrageiras

Luana Pereira Monteiro¹, Camilo Elber Vital¹, Edvaldo Barros², Verônica Aparecida Faustino¹, Rafael Almeida Barros¹, Neilier Rodrigues Silva Júnior¹, Rafaela Zandonade Ventorim³, Jenny Dimelza Arrieta Gómez¹, Juan Diego Rios Diez¹, Alexander Machado Auad⁴, Jorge Fernando Pereira⁴, Humberto Josué de Oliveira Ramos¹, Maria Goreti de Almeida Oliveira¹.

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

²Nucleus of Analysis of Biomolecules - NuBioMol, UFV, Viçosa-MG, Brazil

³Department of Microbiology, UFV, Laboratory of Physiology of Microorganisms, BIOAGRO, Viçosa-MG, Brazil

⁴Entomology Laboratory, Embrapa Dairy Cattle Research Station, Juiz de Fora, MG, Brazil

RESUMO

Diante da importância das pastagens para a alimentação do rebanho brasileiro, o estudo de fatores que possam acometer a sua produtividade são fundamentais para obtenção de material vegetal de maior qualidade nutricional. O ataque de inseto às plantas é um dos maiores causadores de danos nas pastagens. Assim, o estudo da interação insetos-pragas é um importante aliado nesse entendimento. A cigarrinha-das-pastagens *M. spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) acometem os principais gêneros de forrageiras causando-lhes severos danos. Neste trabalho buscamos identificar proteínas diferencialmente expressas nas glândulas salivares de *M. spectabilis*, bem como a sua função desempenhada nos processos biológicos fazendo uso de abordagens de LC/MS aliadas a ferramentas de bioinformática. O agrupamento de proteínas revelou maior número de proteínas envolvidas em processos biológicos de síntese metabólica, estresse biótico/abiótico e transporte de íons através da membrana. O perfil proteico é alterado quando alimentadas com as forrageiras. Identificamos também hormônios nas glândulas salivares como o propósito de averiguar a modulação de respostas de defesa nas plantas hospedeiras assim como a origem desses hormônios. Sugerimos que a presença de microrganismos presentes nas glândulas possam produzir hormônios como forma de defesa.

Palavras-chave: Inseto-praga. Cigarrinha-das-pastagens. Proteômica. Forrageiras. Processos biológicos.

1. INTRODUÇÃO

As áreas de pastagem configuram-se como a maior cultura agrícola do Brasil (IBGE, 2017), o que sugere a produção de pasto como a principal fonte de alimentação para o rebanho brasileiro (Euclides et al., 2010). Apesar de se destacar entre os maiores produtores mundiais de carne e leite, o nível de produtividade na maioria das pastagens no Brasil é considerado baixo devido, principalmente, à ocorrência de insetos, sendo estes responsáveis pela devastação de área foliar e de perfilho (Marion, 2012). Um outro fator importante que afeta a produtividade das pastagens é a exploração predominante das mesmas.

A produtividade de plantas forrageiras decorre da contínua emissão de folhas e perfilhos, processo que é muito importante na restauração da área foliar sob condições de corte ou pastejo (Dias-Filho, 2011). A redução da capacidade produtiva das pastagens está diretamente relacionada com a presença de herbívoros. Outro fator que favorece o desenvolvimento de altas populações de herbívoros é o emprego de áreas produtivas de terra para o cultivo de apenas um tipo de forrageira.

Dentre as espécies que se destacam quanto aos danos nas pastagens estão as cigarrinhas-das-pastagens, como por exemplo a *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera:Cercopidae) (Valério et al., 2001; Argel et al., 2007; Auad et al., 2007). A *M. spectabilis* é uma cigarrinha com aparelho bucal do tipo sugador que se alimenta de gramíneas forrageiras (Resende et al., 2012). Seu mecanismo de alimentação consiste em inicialmente introduzir o estilete no tecido vegetal seguido pela liberação das enzimas salivares. Ao sugar a seiva do xilema, promove a quebra da parede celular causando a morte do tecido foliar e a diminuição da capacidade fotossintética (Valério, 2013). Com isso, o conteúdo de clorofila, de massa seca e a qualidade das gramíneas forrageiras são reduzidos (Souza et al., 2008; Aguiar et al., 2014; Resende, 2014), e aliada a esses fatores a capacidade de regeneração da planta é diretamente afetada (Silva, 2017). Tais impactos conferem a esse inseto um destaque frente à cultura das forrageiras e, conseqüentemente, torna-se um gargalo para a produção extensiva de gado no Brasil (Alvarenga et al., 2019).

As forrageiras mais cultivadas no Brasil são: *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e o capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) (Jank et al., 2014). A *Brachiaria brizantha* apresenta como uma de suas principais características a resistência contra cigarrinhas-das-pastagens. Em contrapartida a *Brachiaria decumbens* tem-se apresentado como a espécie mais susceptível às diversas espécies de cigarrinhas (Valério, 2006; Silva et al., 2017). O capim-elefante (*Cenchrus purpureus*), por sua vez, apresenta características favoráveis para a produção, como boa adaptação

ao clima e solo e alta produção de matéria seca. Quanto a resistência ao ataque da cigarrinha, o cultivar Roxo de Botucatu é considerado mais susceptível que o cultivar Pioneiro (Silva et al., 2017).

Dentro deste contexto, ressalta-se a importância em aumentar a eficiência da seleção de materiais vegetais resistentes a herbívoros visando uma maior produtividade e contribuindo para o desenvolvimento de novas cultivares. Para isso a compreensão da interação do conteúdo salivar dos herbívoros com as forrageiras, aliado ao estudo da proteômica, tem se mostrado como uma promissora ferramenta de estudo.

Estudos de proteômica mostram-se relevantes para o entendimento global e integrado dos processos biológicos, permitindo a compreensão dinâmica do metabolismo através da análise sistemática de proteínas, hormônios e metabólitos expressos pelo genoma (Forslund et al., 2008).

O processo de formação de saliva é altamente regulado e diversas hipóteses têm sido lançadas sugerindo que a saliva de insetos é rica em proteínas secretadas indicadas como efetores na interação planta-patógeno (Carolan et al., 2011). Uma reprogramação do metabolismo da planta para a defesa ao ataque de insetos ocorre pela presença de moléculas efetoras nas glândulas salivares dos mesmos (Guiguet et al., 2016). Estudos recentes desviaram a atenção para novos padrões de respostas moleculares envolvidos nos primeiros eventos que ocorrem durante o ataque de plantas por insetos herbívoros, incluindo a percepção da planta a alterações fisiológicas específicas como liberação de ATP extracelular, aumento da concentração de cálcio no citosol celular e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zebelo e Maffei, 2015).

Esses novos padrões de resposta tem origem na membrana plasmática das células vegetais, sendo desencadeadas tanto por danos físicos quanto por moléculas presentes na saliva dos herbívoros, podendo ser compostos de baixa massa, como os FACs (conjugados de ácidos graxos-aminoácidos) bem como de alta massa, como a enzima glicose oxidase (Acevedo et al., 2015; Shinya et al., 2016; Aljbory e Chen, 2018).

Baseado no impacto econômico que o ataque de herbívoros apresenta frente à produtividade das pastagens, esse trabalho teve como objetivo caracterizar as proteínas e os hormônios diferencialmente identificadas nas glândulas salivares de *M. spectabilis*, alimentada com diferentes variedades de forrageiras, bem como o seu papel nos processos biológicos na interação planta-inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e cultivo das plantas

Plantas de *Brachiaria brizantha* cv Marandu (BB) e *Brachiaria decumbens* cv Basilisk (BD) foram obtidas a partir de mudas cedidas pela Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, Minas Gerais. Já as plantas de *Cenchrus purpureus* cv. Pioneiro (PIO) e *Cenchrus purpureus* cv. Roxo de Botucatu (RX) foram obtidas de estacas oriundas de pastagens do campo experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Tanto as mudas quanto as estacas, foram transplantadas para vasos contendo mistura de solo e substrato comercial Plantmax® na proporção (1:1; v/v). As plantas foram mantidas no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV). No total foram três repetições de cada cultivar, totalizando doze plantas. Os vasos utilizados eram padronizados com volume de 2 litros, com 3 plantas por vaso.

2.2. Infestação das plantas e extração das glândulas

As ninfas de *M.spectabilis* foram coletadas no campo experimental José Henrique Bruschi – Unidade Experimental da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco, Minas Gerais. As cultivares de gramíneas forrageiras, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, *Cenchrus purpureus* cv. Pioneiro e *Cenchrus purpureus* cv. Roxo de Botucatu, foram cultivadas por um período de 30 dias em condições de temperatura e umidade controladas, sendo distribuídas entre três repetições biológicas. Após esse período, as plantas foram envolvidas com sacos de organza e cada vaso foi infestado com um total de sessenta ninfas. Após atingirem a fase adulta, as cigarrinhas foram mantidas se alimentando das plantas por 72 horas e coletadas para a extração das glândulas.

Para a extração das glândulas, as cigarrinhas de cada repetição biológica foram coletadas, transferidas para tubos tipo Falcon de 50 mL e acondicionadas a -20 °C por 10 minutos. Em seguida os pares de glândulas salivares das cigarrinhas de cada vaso (replicata biológica do tratamento - forrageira) foram removidos com o auxílio de lupa e pinça, e acondicionados a -80°C.

2.3. Proteômica

2.3.1. Extração das proteínas

Cerca de 30 mg de glândula salivar foram pesadas em microcubos e adicionados 100µL de metanol 80%. O tecido foi rompido usando sonicador do tipo haste (3 vezes por 10 segundos) (Modelo DE S500 - Ciencor) e mantido a uma temperatura de -20°C por 2 horas. Após centrifugação (10000 rpm, 4°C, 20 minutos), o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1,0 mL de acetona e seco a temperatura ambiente. As proteínas foram solubilizadas com tampão de solubilização (Ureia 7M, Tiourea 2M e CHAPS 4%). A concentração de proteínas totais de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas à uma temperatura de -80°C até o uso.

2.3.2. Eletroforese Monodimensional

As proteínas foram separadas por eletroforese monodimensional descrito por Laemmli (1970). A concentração dos géis de empilhamento e separação foram de 4% e 12%, respectivamente. O tempo de corrida foi de 1h35min, com uma voltagem de 20 mA. Foi aplicado 50 µg de cada amostra por canaleta em triplicata para cada tratamento. As proteínas em gel foram coradas utilizando o corante azul de Coomassie Brilhante (G250), segundo o protocolo (Neuhoff et al., 1985). Cada canaleta foi seccionada em 9 frações de aproximadamente 5mm de espessura e armazenadas a uma temperatura de -20 °C.

2.3.3. Hidrólise trípica

A digestão enzimática das subfrações do gel SDS-PAGE foi efetuada com tripsina de pâncreas suíno, (Proteomics grade/sequencing grade – Promega ®) conforme protocolo descrito por Shevchenko et al. (2006). Para a remoção do corante azul de Coomassie Brilhante (G250), foi realizada a transferência dos fragmentos de géis contendo as proteínas para tubos de 500 µL contendo solução de acetonitrila 50% / bicarbonato de amônio 25 mM para a realização de uma primeira lavagem (12h). Em seguida, procedeu-se outra lavagem com solução de metanol 50% / bicarbonato de amônio 25 mM. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente. Após a solução de descoloração ser totalmente removida, os fragmentos de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min (2 vezes) e secos em Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf ®) por 15 min. Proteínas foram, então reduzidas com DTT 25mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56°C utilizando Thermomixer a 500 rpm. Em seguida, as proteínas foram carboximetiladas com

iodoacetamida a 75 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente (Thermomixer a 500 rpm) na ausência de luz. Os fragmentos de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min por 2 vezes, 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 (20 µg/mL) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0, acetonitrila 10%. A solução com enzima (15 µL) (Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280) foi adicionada fria (4°C) e as amostras foram mantidas em banho de gelo durante 45 min para penetração no gel. Adicionou-se 50 µL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM/acetonitrila 10% e incubou-se a 37°C durante 16 h sob agitação 500 rpm. Os fragmentos de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, agitados a 1500 rpm por 2 min e a solução foi removida para novos tubos. Aos fragmentos de gel restantes foram adicionados 40 µL da solução de ácido fórmico 5% / acetonitrila 50% e 40 µL da solução de ácido fórmico 5% / metanol 60% para recuperar a maior quantidade possível de fragmentos trípticos. Foram novamente mantidos a 1500 rpm por 2 minutos e a solução foi removida e adicionadas ao tubo novo. A solução triptica foi concentrada em Speed Vac até um volume final de 5 µL e acrescida de mais 5 µL de solução contendo acetonitrila 50% / TFA 0,1%.

2.3.4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Os peptídeos trípticos provenientes das digestões enzimáticas foram ressuspensos em 80 µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, centrifugados a 20.000xg por 20 minutos. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi injetada em um sistema LC-MS/MS, composto por um UPLC nano Acquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas modelo micro TOF QII® - QTOF (Bruker Daltonics, Alemanha). A análise cromatográfica ocorreu em uma coluna trap e uma coluna capilar Protecol C18 GHQ303 3,0 µm – 300µm x 150mm, operando com uma taxa de fluxo de 4,5 µL/min. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados em espectrômetro de massas, atuando no modo online, com o auxílio de uma agulha de ionização micro ESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizadas para o programa de gradiente foram: solução A (água e ácido fórmico 0,1% (v/v)) e solução B (acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v)). A programação iniciou por um passo de dessalinização com a manutenção de 5% solução B durante 14 min. Em seguida, um gradiente consistindo de uma rampa de subida linear partindo de 5% até 50% da solução solução B durante 30min, 50% durante 5min, rampa de subida linear partindo de 50% até 90% durante 3min, 90% durante 2min, rampa de descida linear partindo de 90% até 10% durante 3min, seguido pela manutenção a 10% durante 3min. O escaneamento dos íons ocorreu no modo positivo para os espectros de MS1 na faixa de massas entre 100 e 2000 m/z e MS2 entre 70 e 2000 m/z. A aquisição

de dados teve a duração de, aproximadamente, 120 min. O espectrômetro de massas QTOF foi operado no modo autoMSn, o qual adquiriu espectros de MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de carga simples. A aquisição dos dados no QTOF foi gerenciada pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros processados com o auxílio dos aplicativos Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha) e CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. As listas de picos foram geradas nos formatos mascot generic format (*.mgf) e extensible mark-up language (*.mzXML) pelos aplicativos Data Analysis e CompassXport, respectivamente.

2.3.5. Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada confrontando-se as listas de massas geradas contra o banco de dados de proteínas de Insecta (download em 19/02/2015, com 155.960 entradas) depositado no Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Para isso foi usado o aplicativo Peaks, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (Ma et al., 2003). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; carboximetilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Para o QTOF adotou-se uma tolerância de erro de 30ppm para o íon parental e de 0,02Da para os fragmentos. Foram consideradas proteínas identificadas quando apresentaram pelo menos um peptídeo único com False Discovery Rate (FDR) menor que um. Os números de acesso de cada proteína obtida no Peaks foram submetidos ao Uniprot para obtenção do nome, sequência e identificação de proteínas relacionadas produzidas por outros organismos. Usou-se o software String (<https://string-db.org/>) (Franceschini et al., 2013) e como referência dados do banco de proteínas de *Bombyx mori* (bicho-da-seda) para retirar as redundâncias correspondentes a proteínas com sequências semelhantes de organismos distintos que na verdade se referem à mesma proteína.

2.3.6. Categorização funcional das proteínas

Para análise de categorização funcional e enriquecimento de vias foi usado o software Cytoscape (Shannon et al., 2003) com auxílio do 'plug in' ClueGO (Bindea et al., 2009). O uso de ferramentas para interpretação de dados proteômicos se faz cada vez mais necessário, haja visto que é crescente o número de proteínas identificadas em análises proteômicas. Sendo assim, o uso do software Cytoscape aliado ao 'plug in' ClueGo mostram-se de grande importância e eficiência para

esse fim. Com o ClueGo torna-se possível perante uma lista de proteínas, a visualização dos processos biológicos ao qual cada proteína está envolvida. O agrupamento dos processos biológicos é feito de acordo com as proteínas que os compõem, sendo que dentro de cada grupo, é eleito aquele mais enriquecido, ou seja, aquele processo constituinte de maior proporção de proteínas. É de conhecimento que nas células as proteínas participam de diversas vias metabólicas, assim sendo, filtrar os processos mais enriquecidos é importante para uma visão mais ampla daquele de maior relevância.

Usou-se o software String (<https://string-db.org/>) (Franceschini et al.,2013) para conversão em sequências homólogas presentes no bicho-da-seda (*Bombyx mori*) já que é o organismo mais próximo presente no banco de dados do ClueGO. Os identificadores das proteínas presentes nas glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com as diferentes forrageiras foram analisadas quanto aos processos biológicos mais enriquecidos e aqueles exclusivos de cada espécie.

2.4. Quantificação de fitohormônios

2.4.1. Extração

Para extração de hormônios nas glândulas salivares seguimos a metodologia descrita por Coutinho et al.,2019 com modificações. Aproximadamente 30 mg de tecido fresco foi sonificado com adição de 150 µL de solventes de extração (metanol 80%). As amostras foram homogeneizadas em vortex (4 vezes por 20 segundos), sonicadas (5 minutos) e mantidas em gelo (30 minutos). Após centrifugado (13000g, 10 minutos em 4 ° C), 100 µL de sobrenadante foi removido e colocado em um novo tubo. O processo foi repetido com o sedimento resultante e depois os sobrenadantes foram reunidos. Uma última centrifugação (20000g, 10 minutos em 4 ° C) foi feita para remover o restante tecido em suspensão.

2.4.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

A amostra foi injetada automaticamente (5 µl) no sistema LC - MS / MS utilizando uma série Agilent 1200 Infinity acoplada a um triplo quadrupolo de espectrometria de massas (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1, 8 µm, 2, 1 x 50 mm) (Agilent) em série com uma coluna de proteção Zorbax SB-C18 de 1, 8 µm (Agilent). O solvente utilizado foi: (A) ácido acético 0, 02% em água e (B) ácido acético 0, 02% em acetonitrila num gradiente de tempo B: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. A taxa de fluxo do solvente foi de 0,3 ml / min a uma temperatura de coluna de 30 ° C. O método de ionização usado na espectrometria de massa foi uma ESI (ionização por eletrospray) seguindo a seguinte condição: temperatura do gás de 300 ° C, vazão de nitrogênio de 10 L / min, pressão do nebulizador

de 35 psi e voltagem capilar de 4000 V. O equipamento foi operado no modo MRM (monitoramento de múltiplas reações). A massa do íon precursor / fragmento estabelecido foi monitorada por testes de fragmentação de cada molécula: citocininas (zeatina) (220/136), precursor de etileno, ácido laminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (102, 1/56, 2), ABA (263/153), AIA (176/130), SA (137/93), GA3 (345 / 142.9), JA (209/59), GA4 (331/21). As citocininas, AIA e ACC foram analisadas no modo positivo, enquanto ABA, AS, GA3, GA4 e JA no modo negativo. Uma curva de calibração (0,1 ng a 200 ng) usando os respectivos padrões de cada hormônio foi gerada para determinar a quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no software Skyline para obter as áreas de pico de cada hormônio da amostra e os resultados foram expressos em ng / g de tecido fresco.

2.5. Análise estatística

Os dados de fitormônios foram submetidos à ANOVA two-way e as médias foram comparadas usando o teste de Tukey a 5% de significância. Os softwares utilizados foram o SISVAR versão 5.7 (Build 91) e o GraphPad Prism versão 5.01.

3. RESULTADOS

3.1. Proteômica

3.1.1. Agrupamento de proteínas identificadas em glândulas salivares de *M. spectabilis*

As proteínas presentes nas glândulas salivares das cigarrinhas alimentadas com as diferentes forrageiras foram identificadas a partir dos dados gerados por LC/MS, processados no Peaks e verificados no String. Foram consideradas proteínas identificadas quando apresentaram pelo menos um peptídeo único com False Discovery Rate (FDR) menor que um. Os dados foram organizados no Diagrama de Venn (Figura 1) e analisados no ClueGo para identificação de processos biológicos e enriquecimento de vias (Figura 2).

De acordo com o diagrama, 36 proteínas foram identificadas em comum nas glândulas salivares das cigarrinhas submetidas aos diferentes tratamentos. As proteínas totais identificadas nas glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com *B. brizantha*, *B. decumbens*, capimelefante cv. Pioneiro e capim-elefante cv. Roxo de Botucatu foram 94, 116, 99 e 81 respectivamente, e o número de proteínas exclusivas identificadas em cada tratamento foram 29, 47, 31 e 17 respectivamente.

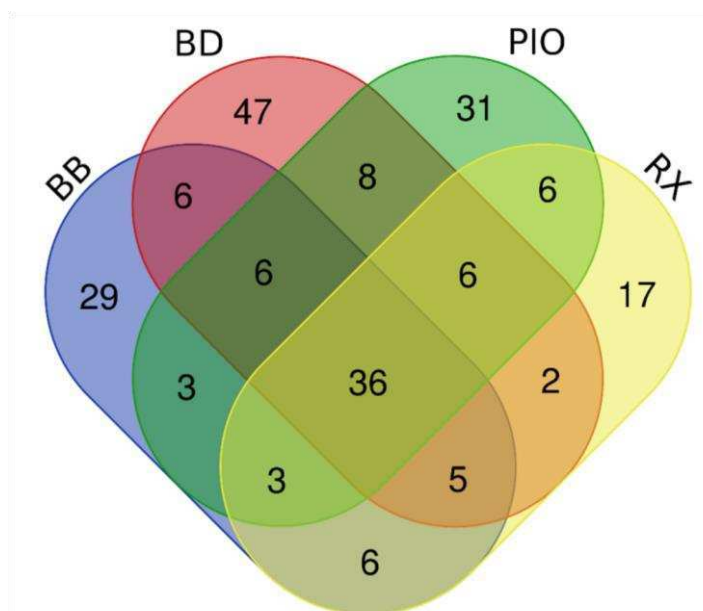


Figura 1 – Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas nas glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com diferentes forrageiras (tratamentos): BB: Brachiaria brizantha, BD: Brachiaria decumbens, PIO: capim-elefante cv. Pioneiro, RX: capim-elefante cv. Roxo de Botucatu. Números em círculos sobrepostos indicam proteínas compartilhadas; (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) – Input dados do String.

3.1.2. Processos biológicos identificados em glândulas salivares de *M. spectabilis*

Foram encontrados nas glândulas salivares de *M. spectabilis* diversas proteínas que são relacionadas a diferentes processos biológicos. A partir da figura 2 podemos destacar os processos mais enriquecidos. Ribossomos, Proteínas de exportação, Fagossomos, Proteínas de processos endoplasmáticos envolvidos com síntese protéica; Regulação da contração muscular, processos de tradução celular como alongação e aminoácidos celulares; Degradação de RNA, que é responsável por não permitir que o RNA se degrade rapidamente; Lipídios de transporte que atuam de maneira a permitir a transferência de lipídios através das membranas; Transporte de ions cálcio transmembrana, cálcio atua no transporte através das membranas; Proteínas de estresse, responsável por proteção contra estresse biótico/abiótico e termoregulação.

Baseado nas suas funções moleculares, os resultados de GO (gene ontology) obtidos revelaram que o grupo de proteínas predominante são relacionados a síntese e transporte de proteínas (ribossomo, proteínas de exportação, fagossomos, processamento de proteínas no retículo endoplasmático, montagem do complexo macromolecular celular, alongamento translacional), mecanismos de controle da musculatura (regulação da contração muscular).

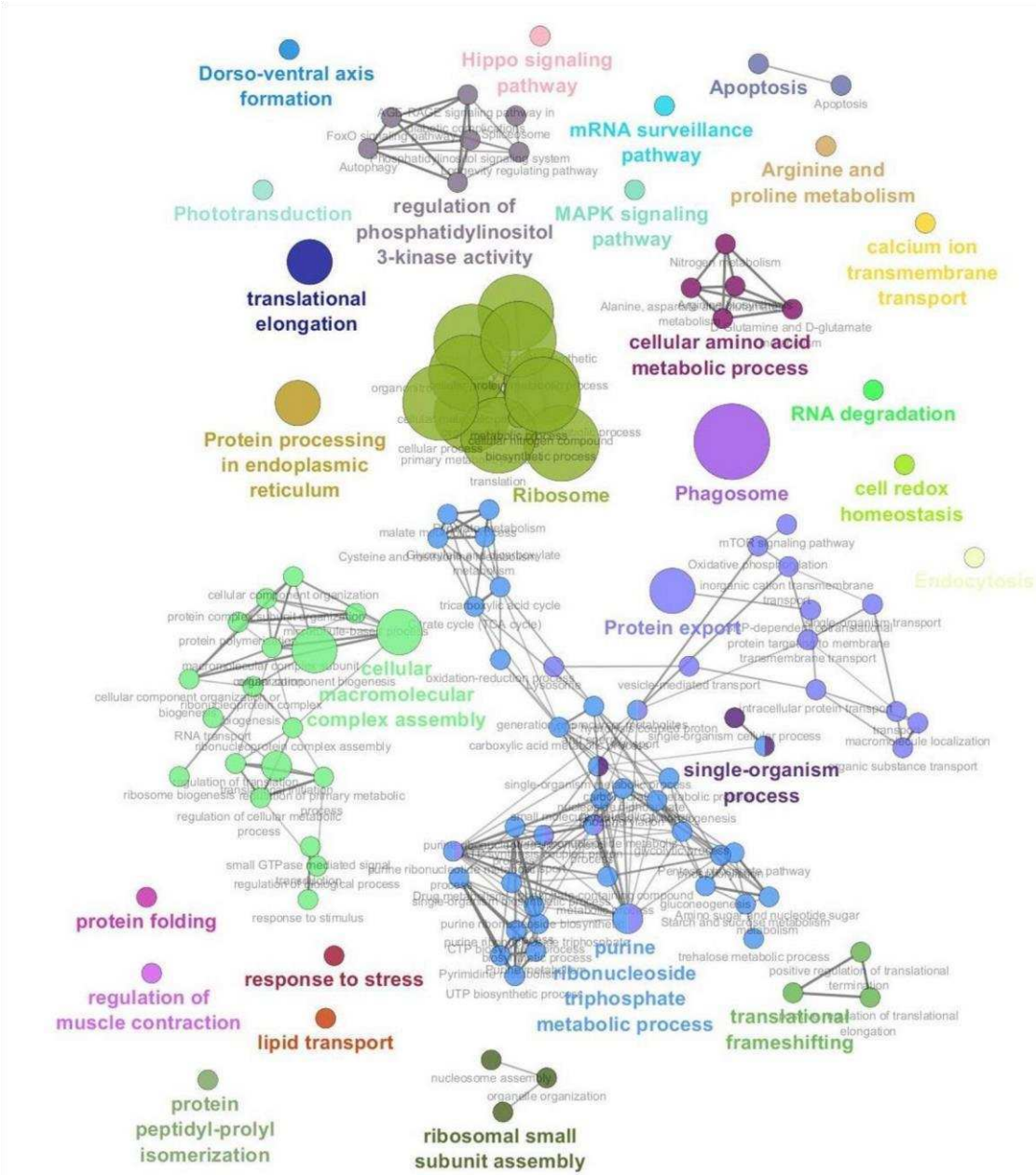


Figura 2 – Classificação da Ontologia Gênica (GO) de proteínas identificadas nas glândulas salivares de *M. spectabilis* - Processo biológico. Os processos biológicos estão associados com proteínas de glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com BB: *Brachiaria brizantha*, BD: *Brachiaria decumbens*, PIO: capim-elefante cv. Pioneiro, RX: capim-elefante cv. Roxo de Botucatu. O tamanho da esfera representa uma maior proporção de proteína identificada nos respectivos processos biológicos. Vias mais enriquecidas são mostradas com círculos maiores nas redes, onde apenas o termo mais significativo de cada grupo foi destacado. As cores se referem aos agrupamentos de processos com proteínas compartilhadas, indicados via conexão por linhas.

3.1.3. Processos biológicos exclusivos em glândulas salivares de *M.spectabilis*

A partir das proteínas identificadas e dos processos biológicos relacionados, cigarrinhas alimentadas com diferentes forrageiras apresentaram diferenças no perfil proteico da glândula salivar.

Com a análise no CleuGO podemos visualizar nas figuras 3 e 4 os processos biológicos que são exclusivos de glândulas salivares alimentadas com as diferentes forrageiras. Os processos biológicos exclusivos encontrados quando alimentados com *B. brizantha* foram lipídios de transporte, homeostase celular, proteínas de exportação e fagossomos. Para o tratamento *B. decumbens* foram processos metabólico ribonucleossídeo de purina, regulação da contração muscular, proteínas de estresse, regulação da atividade de cinases e metabolismo de RNA. O tratamento com capim – elefante cv. Pioneiro apresentou os seguintes processos: processo de iniciação traducional, isomerização de proteínas e por fim o tratamento com capim- elefante cv. Roxo de Botucatu apresentou o processo de sobrevivência de mRNA.

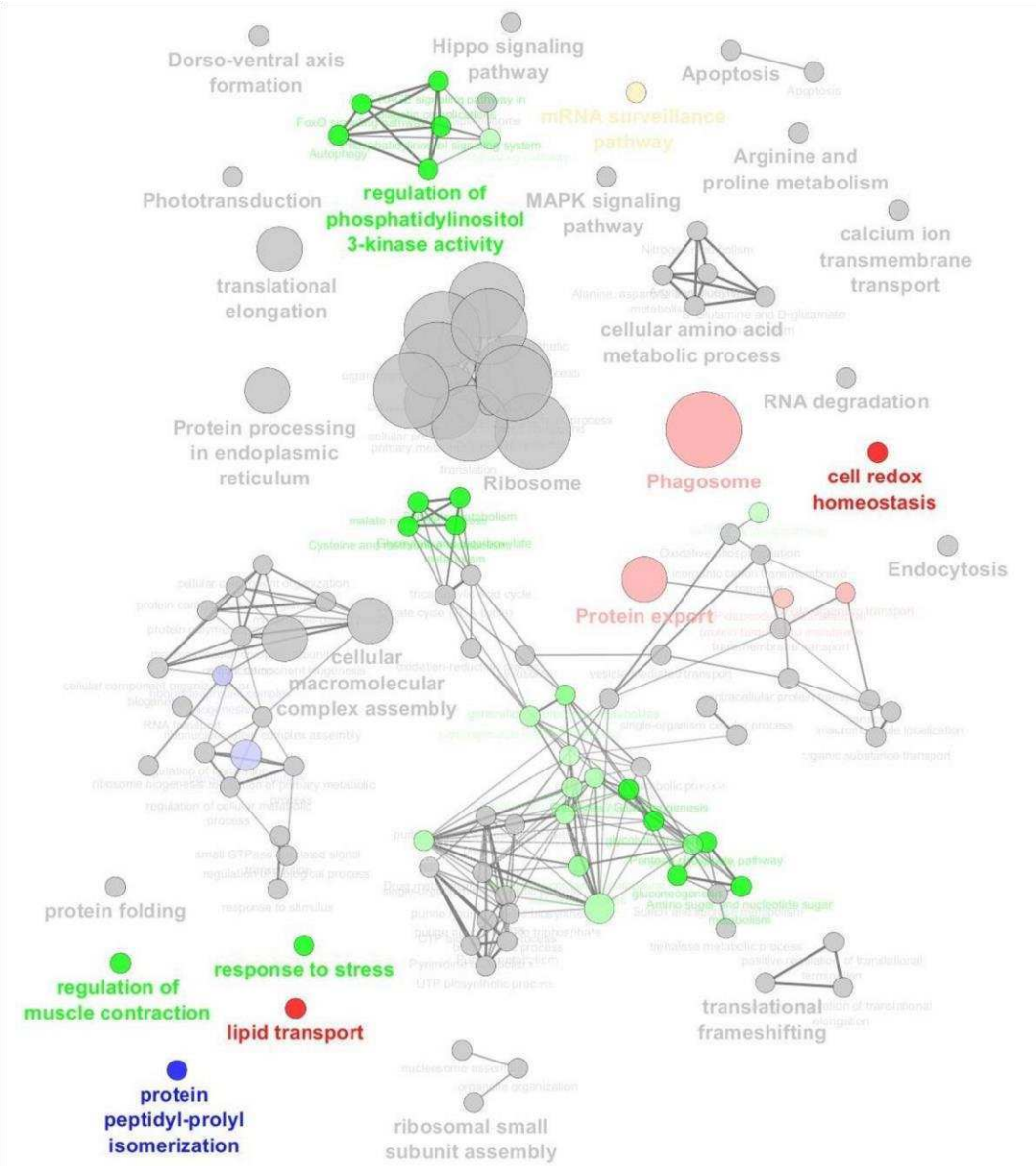


Figura 3 – Processos biológicos identificados por Ontologia Gênica (GO) de proteínas diferencialmente identificadas nas glândulas salivares de *M. spectabilis* entre os tratamentos. Em vermelho estão evidenciados os processos com as proteínas mais expressas exclusivamente nas glândulas salivares das cigarrinhas alimentadas com *Brachiaria brizantha*; em verde, cigarrinhas submetidas a alimentação com *Brachiaria decumbens*; em azul com capim-elefante cv. Pioneiro e em amarelo com capim-elefante cv. Roxo de Botucatu. Cores mais intensas indicam processos biológicos com proteínas exclusivas em cada. Em cinza são mostrados processos biológicos com proteínas que não detêm exclusividade de nenhum tratamento.

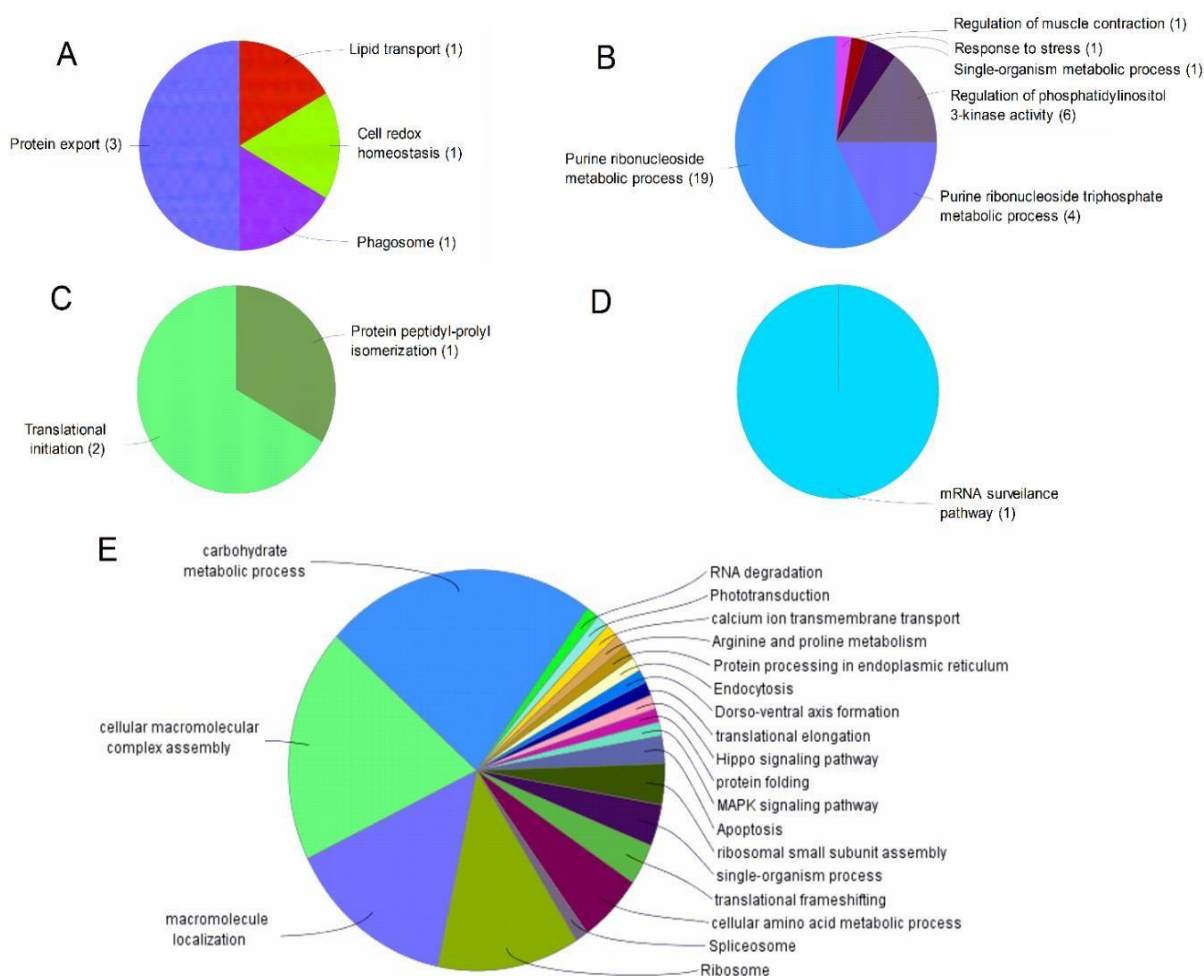


Figura 4 – Processos biológicos exclusivos encontrados em glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com diferentes forrageiras. **A:** *B. brizantha*, **B:** *B. decumbens*, **C:** capim – elefante cv. Pioneiro, **D:** capim – elefante cv. Roxo de Botucatu, **E:** conjunto de processos biológicos com proteínas que são comuns identificados nos diferentes tratamentos. A denominação de cada processo biológico é determinada através do termo mais significativo dentro de cada grupo. Entre parentêses estão os números de processos biológicos que compõem cada rede de interação.

Tabela 1 – Relação dos processos biológicos, suas respectivas proteínas específicas e suas funções dentro de cada tratamento.

Treatment	Biological process	Protein	Function
<i>Brachiaria brizantha</i>	Lipid transport	VG	Vitellogenin
	Protein export	HSP70 Sec61alpha Srp68	Heat shock protein 70-3 Transport protein Sec61 Signal Recognition Particle 68
	Cell redox homeostasis	Pdi	Protein disulfide isomerase
	Phagosome	A1 Crt LOC100037422 LOC100037424 Sec61alpha Tua1 and Tua 2 Tub 1 and Tub 4	Vacuolar ATPase Calreticulin Vacuolar ATPase B subunit Protein-coding Transport protein Sec61 Transport protein Sec61 Tubulin alpha chain
	Regulation of muscle contraction	LOC692913	Troponin T
	Response to stress	Hsp90	Heat shock protein 83
	Purine ribonucleoside metabolic process	LOC100037422 LOC100037426 LOC100101186 LOC692926 LOC778462	Vacuolar ATPase B subunit Enolase Nucleoside diphosphate kinase ATP synthase subunit alpha Glucose-6-phosphate isomerase
	Purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	LOC100037422 LOC100037426 LOC100101186 LOC692926 LOC778462	Vacuolar ATPase B subunit Enolase Nucleoside diphosphate kinase ATP synthase subunit alpha Glucose-6-phosphate isomerase
	Single-organism metabolic process	LOC100037422 LOC100037426 LOC100101186 LOC100329146 LOC101738358 LOC692939 LOC692952 LOC778462 Pi3k60 Treh-2	Vacuolar ATPase B subunit Enolase Nucleoside diphosphate kinase Isocitrate dehydrogenase Electron carrier protein Glutamate dehydrogenase Malate dehydrogenase Glucose-6-phosphate isomerase PI3K protein Trehalase

	Protein peptidylprolyl isomerization	Cypa	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Capim- elefante cv. Pioneiro	Translational initiation	Eif-4C LOC692936 eIF3c LOC693075	Eukaryotic translation initiation factor 4A Eukaryotic translation initiation factor 3 Eukaryotic translation initiation factor 5A Translation initiation factor 5A
Capim- elefante cv. Roxo- deBotucatu	mRNA surveillance pathway	Pabp	Polyadenylate-binding protein

3.2 Fitormônios identificados em glândulas salivares de *M.spectabilis*

Os hormônios etileno (Figura 5B), ácido jasmônico (Figura 5D) e metil jasmonato (Figura 5F) nas glândulas salivares das cigarrinhas alimentadas com *B. brizantha* e *B. decumbens* não apresentaram diferenças nas suas concentrações. As concentrações de ácido abscísico (Figura 5A), ácido indoalcético (Figura 5C) e zeatina (Figura 5G) apresentaram o mesmo comportamento nas suas concentrações entre as Brachiarias, mostrando-se maior na *B. brizantha*. A concentração de ácido salicílico foi maior na *B. decumbens* quando comparada a *B. brizantha* (Figura 5E). Em glândulas de insetos alimentados com capim-elefante cv. Pioneiro e Roxo de Botucatu, as concentrações de ácido abscísico (Figura 5A), ácido jasmônico (Figura 5D), ácido salicílico (Figura 5E) e metil jasmonato (Figura 5F) não apresentaram diferenças. Já os hormônios etileno (Figura 5B), ácido indoalcético (Figura 5C) e zeatina (Figura 5G) apresentaram concentrações maiores na cv Roxo de Botucatu em relação a cv Pioneiro.

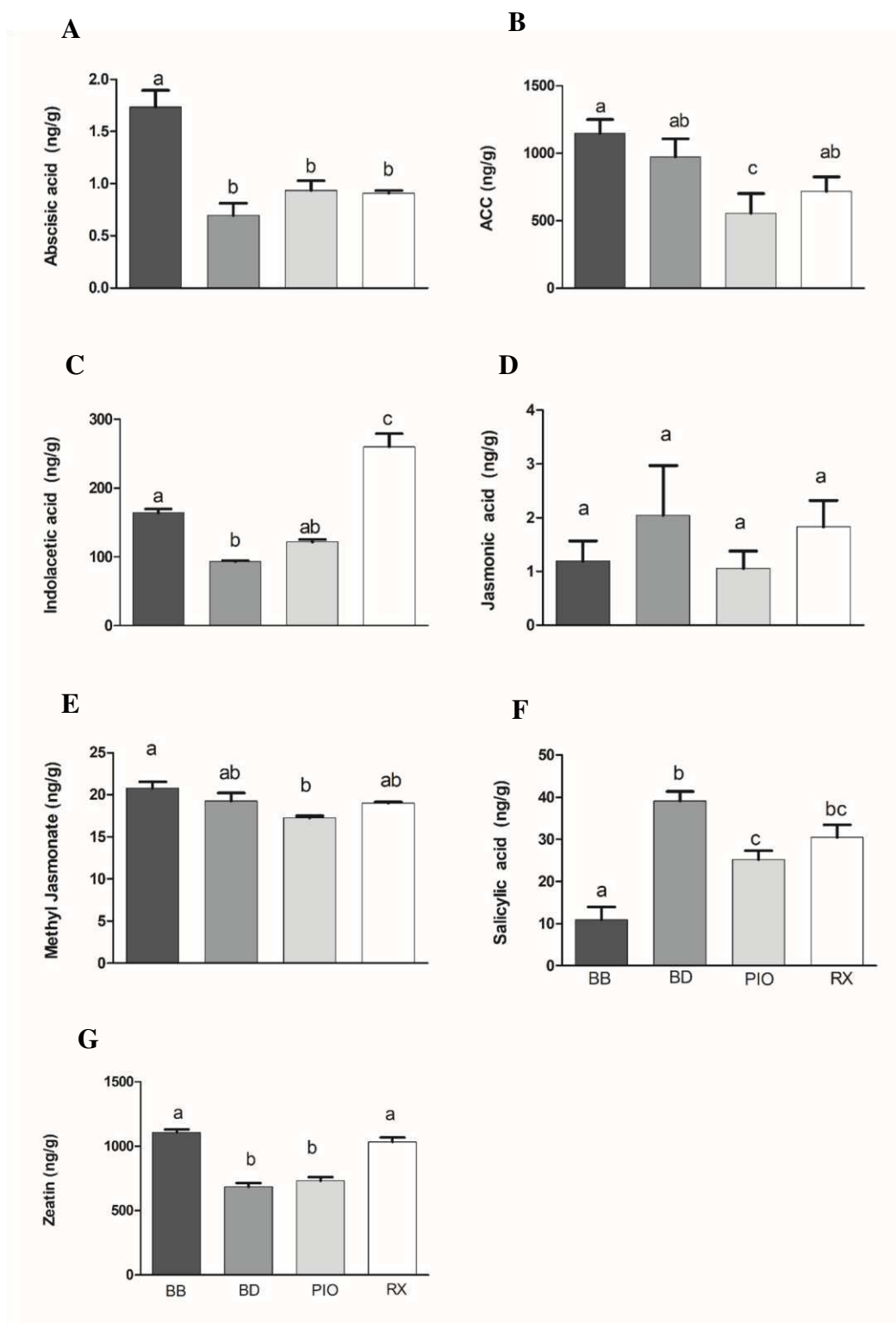


Figura 5 – Perfil fitormonal nas glândulas salivares de *M. spectabilis* após infestação em diferentes forrageiras - BB: Brachiaria brizantha, BD: Brachiaria decumbens, PIO: capim-elefante cv. Pioneiro, RX: capim-elefante cv. Roxo de Botucatu. (A) Ácido abscísico, (B) Etileno, (C) Ácido indolacético, (D) Ácido jasmônico, (E) Metil jasmonato, (F) Ácido salicílico, (G) Zeatina. Barras (Média \pm EP; n = 4) com as mesmas letras não indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste de Tukey P <0,05).

4. DISCUSSÃO

4.1 Processos biológicos identificados em glândula salivar de *M. spectabilis*

As glândulas salivares têm como principal função a secreção de fluídos e proteínas durante a alimentação (Gatehouse, 2002). A saliva dos insetos é a primeira secreção a entrar em contato com a planta durante a alimentação (Peiffer and Felton, 2005; Dussourd et al., 2016). O complexo de componentes salivares que os herbívoros utilizam para se alimentar das plantas oferece uma excelente oportunidade para estudar a interação entre as defesas da planta hospedeira e as possíveis contramedidas dos herbívoros a essas defesas (Afshar et al., 2013).

Portanto, para que possamos compreender a interação dos processos biológicos com as proteínas secretadas, bem como as modulações dos efetores frente a interação planta-inseto devemos enfatizar a estrutura das glândulas salivares desses herbívoros. Posteriormente a análise do perfil proteômico da saliva nos direcionara a quais processos biológicos estão operantes durante a interação planta-praga.

Nunes e Camargo-Mathias (2001) descreveram as glândulas salivares da cigarrinha *M. fimbriolata* como sendo estruturas pareadas localizadas lateralmente em cada lado da cabeça, correspondentes à glândula principal (porção acinosa) e à glândula acessória (porção filamentosa). A glândula principal apresenta ainda uma subdivisão em quatro lóbulos, onde no interior de cada lóbulo estão localizados numerosos grânulos de secreção proteica. Cada um desses lóbulos apresentam características singulares quanto a sua morfologia, indicando assim que cada lóbulo possa exercer uma função diferente além de produzir secreções com constituições distintas (Jurand et al., 1975; Sharma et al., 2014; Will, 2016). Esta morfologia é semelhante à descrita por Roma et al. (2003) para as glândulas salivares da cigarrinha *M. posticata*.

Apesar de já ser descrito por Tsai e Perrier (1996) a falta de um reservatório para a secreção salivar nas glândulas salivares de *M. fimbriolata*, estudos de Nunes et al. (2006) mostraram que a secreção produzida por um dos lóbulos se difere das demais em termos de concentração de proteína e tamanho dos grânulos sugerindo assim que um desses lóbulos possa ser usado com reservatório de secreção para que o inseto possa usar em períodos de adversidades.

Relatamos a presença de proteínas digestivas, como a ATPase vacuolar, presente no processo biológico fagossomo. Quando os fagossomos estão unidos aos lisossomos geram uma estrutura denominada vacúolo autofágico onde fica localizado as partículas englobadas e as enzimas responsáveis pelo processo de digestão, sugerindo uma renovação constante da atividade secretora

corroborando com os estudos de Nunes et al., 2006 a respeito da presença de um reservatório para a secreção salivar.

A ATPase vacuolar desempenha diferentes funções, e aliada ao fagossomo fornece o ambiente ácido necessário para a degradação das macromoléculas pelas enzimas digestivas. A ação da ATPase vacuolar como proteína digestiva já foi relatada a partir das glândulas salivares de diferentes insetos da ordem Hemiptera (Oliveira- Neto et al., 2003). Acevedo (2015) relata também que a ATPase possui a função de regulação das respostas de defesa em várias plantas hospedeiras, podendo ativar proteínas do tipo cinase que estimulam a via do ácido jasmônico, que levam a indução de defesas diretas e indiretas nas plantas.

Por secretarem saliva durante todo o processo de alimentação, as glândulas salivares são estruturas que apresentam uma alta atividade metabólica. Identificamos as proteínas EF1a (fator de alongação) e TEF2 (fator de alongamento de translação) que atuam no início e na regulação do processo de tradução. Como descrito por Hinnebusch, 2014, a proteína EF1a age especificamente em busca do códon de iniciação da tradução, etapa essencial para a síntese de proteínas. Essas proteínas foram descritas no processo de alongação translacional.

A presença de proteínas ribossomais está relacionada com uma alta taxa de síntese proteica durante o processo de maturação do conteúdo salivar no interior das glândulas, uma vez que cada lóbulo da glândula principal produz um tipo deferente de secreção sendo então necessário todo um aporte metabólico. Aliado as proteínas ribossomais e ao processo de síntese proteica, Nunes et al. (2006) relatam a presença de células ricas em mitocôndrias e retículo endoplasmático nas glândulas salivares de *M. fimbriolata*, o que nos permite dizer que essas organelas fornecem a energia na forma de ATP e também, no transporte de substâncias, na exportação e na síntese de proteínas.

Descrevemos também a presença de processos biológicos relacionados ao controle da musculatura. Associadas a esse processo estão as proteínas de constituição muscular como as troponinas. Esse processo é de extrema importância uma vez que o conteúdo salivar para ser expelido requer força para translocar pelos ductos. Habibi et al. (2008) destacam que as células secretoras dos lóbulos da glândula principal, bem como as que compõem os filamentos das glândulas acessórias, são envolvidas por uma camada de células musculares que possuem a função de auxiliar no transporte do produto da secreção para o interior dos ductos por contração. A energia necessária para que esse processo ocorra é suprida pelas células mitocondriais que estão associadas as células musculares em torno do ducto.

Além de atuarem no papel de fornecer energia, a presença das mitocôndrias também está associada aos grânulos de secreção no lóbulo das glândulas salivares de *M. fimbriolata* (Nunes et al., 2006) podendo estar relacionado com a produção de secreção lipídica (Caetano et al., 2002).

A presença do processo biológico referente a transporte de lipídeos está associado a proteína PDI (Proteína Dissulfeto Isomerase), que é associada indução de células lipídicas em insetos e transferência de lipídeos através da membrana (Francischetti et al., 2007). Segundo Caetano et al. (2002), sob condições de fome, células das glândulas pós-faríngeas de *Dinoponera australis* quando associadas as proteínas PDI se degradam para formar gotículas lipídicas.

Outro processo identificado foi o transporte transmembrana. A proteína ATPase transportadora de cálcio, catalisa a hidrólise do ATP acoplada ao transporte de íon cálcio. Saliva contém enzimas que podem interagir com o cálcio livre dentro do tecido da planta. Como o cálcio é um importante componente de vias de sinalização de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, essas interações podem desempenhar um papel fundamental na alimentação das plantas evitando respostas de defesa pelas mesmas (Will et al., 2012).

Por se tratar de um órgão com alta síntese de proteínas, as glândulas salivares requerem mecanismos de defesa contra a degradação de RNA. Uma das formas de evitar a degradação está associada a proteína PABP (proteína de ligação ao RNA). A degradação pode ser evitada através da interação da PABP com proteínas que regulam a tradução, que são responsáveis por adicionar nucleotídeo ao pré-mRNA antes da tradução, e ao turnover de mRNA. A PABP também é responsável por estimular a tradução de mRNA através das suas interações com fatores de tradução associados ao fator de iniciação eucariótica EIF4g (Smith et al., 2014; Kahvejian et al., 2005).

Fundamentado nas proteínas e processos biológicos descritos como fagossomo, transporte de lipídeos, controle da musculatura, transporte transmembrana, processos metabólicos, alongação translacional e degradação de RNA, os resultados vão de encontro a ultraestrutura descrita por Nunes (2006), onde os principais processos aqui discutidos se relacionam com um órgão com alta atividade metabólica e síntese proteica evidenciado pela presença significativa de mitocôndrias, grânulos de secreção e proteínas ribossômicas.

4.2 Processos biológicos exclusivos em glândula salivar de *M.spectabilis*

A saliva de insetos exerce um papel fundamental no início do processo de alimentação, uma vez que ela é responsável pela quebra da parede celular dos tecidos vegetais através da ação de seus constituintes como proteinases, amilases e fosfolipases (Backus et al., 2013).

Após ser injetada, a saliva funde-se com secreções da planta sendo bombeada até o intestino para a completa digestão. A planta responde ao ataque de herbívoros com compostos químicos, denominados de compostos vegetais secundários como aminoácidos não proteicos, alcalóides, aminas e fenóis simples com a finalidade de dificultar o acesso dos herbívoros às plantas, podendo afetar o desenvolvimento e a reprodução dos insetos (Lucas et al., 2000).

Estudos acerca de efetores salivares produzidos por herbívoros vêm sendo relatados, porém a caracterização funcional das proteínas secretadas ainda não é bem esclarecida (Dhawan et al., 2017; Hai-Jian Huang et al., 2019). Portanto, pouco se sabe sobre os processos de secreção de proteínas salivares e o efeito da alimentação sobre o proteoma salivar em insetos.

Em glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com *B. brizantha*, os processos exclusivos identificados foram transporte de lipídeos, homeostase de células redox sendo identificados através das proteínas vitelogenina (VG) e proteínas dissulfeto isomerase (PDI) respectivamente (Tabela 1). A vitelogenina é uma lipoproteína sintetizada no corpo gorduroso e liberada na hemolinfa, carregam cátions como o cálcio através da membrana plasmática para o retículo endoplasmático onde ocorre a sua biossíntese (Yang et al., 2013). A proteína PDI está associada aos processos de secreção, transporte e maturação de proteínas secretadas, além de atuar como importante componente no desdobramento proteico e atividade de síntese de novas proteínas (Peng et al., 2017).

Ribeiro et al. (2007) relatam a presença de proteína PDI em glândulas salivares de *Aedes aegypti* relacionando com a alta síntese proteica, conferindo a esse inseto maior capacidade de ativação proteica e capacidade imunológica. Estudos de Wu et al. (2019) demonstram em saliva de mosca - branca (*Bemisia tabaci*) que o nível de PDI aumenta em até duas vezes quando alimentadas com cultivares resistentes de pimenta.

Processos como o transporte de proteínas e fagossomo também foram identificados em glândulas salivares porém não com total exclusividade para a *B. brizantha*. As proteínas associados ao transporte de proteínas são as de choque térmico - HSP70, proteínas de transporte - Sec61alpha, e partículas de reconhecimento de sinal 68 - SRP68, enquanto as proteínas associados ao fagossomo são as proteínas ATPase vacuolar - A1 e LOC10037422, Calciumbinding - Crt, Proteína de codificação - LOC10037424, Proteína de transporte - Sec61alpha, Tua1 e Tua 2 e Proteínas formadoras de microtúbulos - Tub 1 e Tub 2 (Tabela 1).

Uma resposta bem definida ao estresse envolve a maior produção de proteínas de choque térmico, que visam manter a condição celular adequada, limitando a produção e o acúmulo de constituintes induzidos pelo estresse (Wu et al., 2019).

Identificamos as proteínas HSPs (Proteínas de choque térmico) do tipo HSP70 para a interação com *B. brizantha*, estando essa proteína envolvida em processos de termotolerância especialmente sob condição de estresse e alta temperatura, metabolismo de ATP, além de garantir o dobramento adequado de proteínas recém sintetizadas evitando assim a desnaturação (Mittler, 2002). Estudos recentes de Merret et al., 2017 descrevem que as HSPs são capazes de controlar a tradução de mRNA sob condições normais ou de estresse, estando envolvidas na restauração de fatores de tradução como a EIF4a. As proteínas HSPs são necessárias para a rápida liberação de mRNAs dos grânulos de estresse resultando no rápido restabelecimento da tradução, produzindo assim novas proteínas ribossômicas (McLoughlin et al., 2016).

O estresse térmico pode prejudicar a síntese e o transporte de proteínas, divisão celular e a secreção de hormônios entre os insetos (Lu e Wan, 2010). Desta forma, os insetos desenvolveram estratégias para ajustar as temperaturas a partir das suas próprias necessidades, inclusive durante a alimentação. Benoit et al., 2011 mostraram que em glândulas salivares de *Aedes aegypti* pode ocorrer um aumento das proteínas HSP70 durante a alimentação, protegendo assim a função proteolítica das enzimas que potencialmente poderiam ser prejudicadas pelo súbito aumento de temperatura.

Ao enfrentar altas temperaturas, na tentativa de manter viáveis o metabolismo da glândula salivar, as proteínas sHSPs possuem potencial para acionar o dobramento de proteínas, afetado pela disponibilidade de ATP. Havendo disponibilidade de ATP, as proteínas podem se ligar de forma estável as HSPs, uma vez que a ligação do substrato ao sHsps é independente do ATP, porém um aumento da quantidade de sHSPS-ATP potencializa a proteção da proteína (King & MacRae, 2015).

O movimento eficiente de proteínas através das membranas é necessário para a saúde celular. O processo de translocação é particularmente desafiador quando o canal da membrana através da qual as proteínas devem passar é estreito - como os das membranas do retículo endoplasmático e mitocôndrias. HSP70 desempenham papéis em ambos os lados dessas membranas, garantindo translocação eficiente de proteínas sintetizadas em ribossomos no interior dessas organelas (Craig, 2018).

Nossos resultados corroboram com as evidências de que a presença de sHSPS-ATP na glândula salivar de *M. spectabilis* contribui para o aumento do metabolismo e auxilia na defesa das

células contra a perda de proteína induzida pelo estresse frente a alimentação com diferentes forrageiras.

A Sec61alpha é uma proteína presente no retículo endoplasmático responsável pela mediação da translocação de polipeptídios recém sintetizados pela membrana, garantindo o sucesso do processo metabólico (Lang, 2017). Estudos de Demangel et al. (2018) com bactérias *Mycobacterium ulcerans* produtoras da toxina micolactona mostram que a ligação dessa toxina a Sec61alpha inibe fortemente a capacidade de translocação de polipeptídeos recém sintetizados pela membrana plasmática, diminuindo assim a capacidade de produção de novas proteínas.

Alguns estudos sobre transporte de proteínas pelas membranas, envolvem as proteínas SRP68 (partículas de reconhecimento de sinal). A SRP68 liga-se à sequência de um peptídeo recém-sintetizado à medida que emerge do ribossoma. Essa ligação leva à síntese de proteínas, uma função da SRP68 que facilita a tradução e a translocação da proteína no retículo endoplasmático (Zimmermann et al., 2011).

Dentro do processo fagossomo, destacamos a presença das proteínas Tub 1 e Tub 2 (tubulinas) responsáveis pela formação dos microtúbulos do citoesqueleto celular. Os microtúbulos são necessários para a manutenção da estrutura celular bem como auxiliam no transporte através da membrana (Chumová et al., 2019).

Outra proteína que se destaca dentro do processo fagossomo é a Crt- Calreticulina. Como consequência da evolução, alguns componentes existem na saliva dos insetos para prevenir as defesas das plantas e ajudar na ingestão da seiva de floema. Após o ferimento ocorre um influxo de cálcio no lúmen dos elementos tubulares do floema. Esse aumento na concentração de cálcio desencadeia o fechamento do local onde foi inserido o estilete do inseto (Knoblauch et al., 2003). A Crt é uma proteína que pode inibir a oclusão dos orifícios dos tubos do floema, como já foi relatado na saliva de pulgões (Aphidoidea) por Carolan et al. (2011).

Feridas não só desencadeiam a liberação direta de cálcio nas células, mas também induzem o acúmulo de ATP induzindo assim a resposta de defesa da planta (Roux et al., 2007). Em glândulas salivares de mosca-branca (Aleyrodidae), Ratzka (2002) relata a presença da proteína secretora nucleotidase 1 que possui função de hidrólise do ATP e é ativada por cálcio. É provável que a proteína de ligação ao cálcio tenha uma função de redução da concentração de ATP extracelular e prevenção da resposta de plantas durante a alimentação dos herbívoros.

De acordo com estudos de Will et al. (2013), quando a saliva não suprime a resposta de defesa da planta, são ativados os canais de Ca^{2+} na membrana plasmática dos elementos crivados para a

formação de calose (polímero β -1,3-glicano), que são sistematicamente sinalizados e induzem a obstrução dos poros dos elementos crivados para evitar a perda da seiva.

Em glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com *B. decumbens* os processos exclusivos identificados foram estresse abiótico, regulação da contração muscular e regulação da atividade de 3- cinase fosfatidilinositol representados pelas proteínas HSP90, Troponina (LOC692913) e PI3K60 respectivamente (Tabela 1).

As proteínas HSP90 auxilia outras proteínas a se dobrarem adequadamente protegendo contra perdas, estabilizando-as contra o estresse térmico, biótico e abiótico (Wu et al., 2019). A nível de glândula salivar, o inseto está respondendo expressando uma proteína que está relacionada ao estresse, o que pode favorecer assim o melhor estabelecimento na planta.

Regulação da contração muscular é um processo de extrema importância nas glândulas salivares, pois é ele o responsável pela secreção do conteúdo salivar para o meio externo. A proteína envolvida nesse processo é a troponina que aliada a outras proteínas de contração muscular regulam a força e a velocidade da contração muscular (Chisenhall et al., 2014a).

De acordo com Nunes et al. (2006), a presença de músculos nas glândulas salivares pode estar associada aos mecanismos de controle do transporte de saliva e os músculos provavelmente contribuem para a regulação das secreções liberadas dos diferentes lóbulos das glândulas salivares. Em *Peregrinus maidis* Ashmead (Delphacidae) os músculos foram relatados externamente aos ductos salivares (Ammar, 1986).

Peng et al. (2018) relatam a ação da proteína PI3K60 como uma proteína potencialmente envolvida na síntese e na degradação lipídica em diferentes estágios das larvas de *Bombix Mory* através da análise de enriquecimento dos processos biológicos, sugerindo assim que ocorrem diversas mudanças metabólicas no corpo dos insetos durante a metamorfose que pode afetar diretamente a fase adulta.

Dados de GC/MS de glândulas salivares de *M. spectabilis* (Saraiva, 2018) indicam grandes concentrações de lipídeos, tais como ácido octadecanóide, ácido fosfórico, prostaglandina A2, ácido tetradecanóico, ácido hexadecanóico, ácido heptadecanóico, ácido heptadecanóico, ácido eicosanóico e metilo palmitato que são moléculas atuantes como moduladores da resposta da planta hospedeira. Secreções orais de *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), apresentaram moléculas de ácido graxo em sua constituição que leva a uma formação de canais permeáveis a íons, facilitando a alimentação do herbívoro (Howe, 2008). A presença de ácidos graxos parece ser

comum na saliva dos insetos, uma vez que sua presença já foi relatada em diversas espécies (Pohnert et al., 1999; Alborn et al., 2000; Halitschke et al., 2001; Mori et al., 2003; Yoshinaga et al., 2007).

Resultados de Tumlinson and Engelberth (2008) mostram também que as secreções de insetos também contêm ácidos graxos e proteínas que induzem as defesas das plantas. Secreções orais de várias espécies de lagartas contêm conjugados de ácidos graxos e aminoácidos alguns dos quais são fortes elicitores de defesa (Yoshinaga et al., 2014).

Segundo Bruce (2015), como forma de impedir a herbivoria por insetos, todas as plantas emitem produtos derivados de lipídeos, sendo que em muitos casos, eles são capazes de atrair inimigos naturais do inseto atacante, permanecendo muitos desses compostos ligados à superfície da folha atuando como inibidores do forrageamento devido ao seu sabor pouco palatável aos insetos. Algumas dessas substâncias voláteis emitidas por plantas infestadas também podem atuar como sinais para que as plantas vizinhas, não infestadas, iniciem a expressão de genes relacionados à defesa (Mi-1, Bph14 e Vat) (Taiz e Zeiger, 2013).

Glândulas salivares de insetos alimentados com o capim- elefante cv. Pioneiro, apresentaram o processo Isomerização da proteína peptidil-prolil com exclusividade com a proteína Peptidil-prolil cis-trans isomerase (Cypa). Sua função está relacionada com aceleração do enovelamento proteico, transporte de proteínas e regulação da transcrição (Prakash et al., 2016) (Tabela 1).

Galat (2003) retrata a presença da Cypa como sendo secretada ou associada a mitocôndrias em *Drosophila*, podendo também estar associadas a proteínas de choque térmico, o que favorece uma maior síntese de proteínas nas glândulas salivares. A Cypa possui atividade de regulação da transcrição, agindo como proteínas de ligação ao RNA, envolvidas diretamente na modificação e transporte de RNA após a transcrição como foi descrita por Adams et al. (2005).

A eficiência da Cypa chega a ser comparada a HSP90 no que se refere a sua capacidade de manter a proteína em seu estado competente de enovelamento o que garante proteção contra perda de proteínas recém sintetizadas. Proteínas peptidil-prolil-isomerase possuem a capacidade de se ancorar a proteínas envolvidas com o ‘splicing’ para ajudar no arranjo adequado das proteínas recém sintetizadas durante a transcrição, com a finalidade de mantê-las organizadas evitando interações não desejáveis (Mukhtar et al., 2019).

E, por fim, em glândulas salivares de insetos alimentados com capim- elefante cv. Roxo – de – Botucatu, foi identificada a Proteína de ligação a poliadenilato (PABP) representando o processos de via de controle da não degradação RNA mensageiro (Tabela 1).

A PABP é responsável pela estabilização e manutenção de níveis constantes de mRNA conferindo proteção contra a degradação e evidenciando uma maior síntese proteica (Kerwitz et al., 2003). Uma maior estabilização de RNA leva a uma maior síntese de proteínas.

Essa maior estabilização poderia ser vantajosa durante o processo de infestação, pois na interação planta – inseto ocorreria um aporte maior de proteínas sintetizadas facilitando para o inseto se alimentar da planta. Isso corrobora com a maior susceptibilidade dessa cultivar frente ao ataque de herbívoros.

A saliva da lagarta (*Spodoptera frugiperda*) induz respostas de defesa em milho, como foi recentemente mostrado por Acevedo et al. (2018), que as linhagens de “milho” e “arroz” infestadas por esse inseto induzem respostas diferenciais de defesa da planta devido a diferenças na composição proteômica na saliva do herbívoro quando alimentadas com diferentes linhagens de plantas.

Assim podemos inferir que em glândulas salivares de *M. spectabilis* alimentadas com diferentes forrageiras, o perfil de proteínas identificadas mostra-se distintos devido as fontes de alimentação as quais o inseto é submetido.

4.3 Perfil hormonal de glândulas salivares de *M. spectabilis*

Herbivoria é definida como uma relação ecológica em que partes de uma planta viva servem de alimento para um inseto. Sendo, desse modo, uma relação desarmônica já que a planta é prejudicada enquanto o inseto se beneficia (Buchner, 2004). A herbivoria dos insetos induzem respostas nas plantas que são frequentemente moduladas por componentes presentes na saliva dos insetos, e a presença de proteínas e pequenas moléculas na saliva atuam como efetores de defesa de resposta nas plantas (Acevedo et al., 2018).

Zarate et al. (2007) descrevem que a resposta de defesa das plantas a insetos herbívoros são mediadas pela ação de hormônios. Etileno (ACC), ácido jasmônico (AJ) e metil jasmonato (MeJa) são vias de respostas frequentemente ativadas nas plantas frente a herbivoria de insetos, na tentativa de proteção com a indução de inibidores de proteínas. Esses hormônios funcionam como moléculas de sinalização para ativar genes envolvidos em respostas de defesa de plantas a danos. O ácido salicílico (AS) tende a ser induzido em resposta a defesa contra patógenos.

Algumas evidências sugerem que plantas são capazes de interagir com uma variedade de sinais para regular a defesa de maneira específica através da ação de ácido jasmônico, etileno, ácido salicílico (Erb et al., 2012) e o ácido abscísico (ABA) foi apontado recentemente como importante

regulador de defesa, estando associado no processo de sinalização, induzindo respostas de defesas dependentes de ácido jasmônico e metil jasmonato (Nguyen et al., 2016; Zhang et al., 2017).

O papel da Zeatina está associado com diversas interações biótico-vegetais e um aumento em suas concentrações é comumente observado após ataque de insetos ou patógenos, sugerindo que pode ser usado para modificar o metabolismo da planta em resposta a infestação (Zhang et al., 2017). O ácido indoacético (AIA) é uma auxina, um hormônio que regula o crescimento e a divisão de células vegetais (Suzuki et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram a presença de sete hormônios: ácido abscísico (ABA), etileno (ACC), ácido indolacético (AIA), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), metil jasmonato (MeJa) e zeatina nas glândulas salivares. Embora esses hormônios sejam descritos em plantas, trabalhos de Giron et al. (2013) apontam para a produção de hormônios em glândulas salivares de insetos, que podem modular respostas de defesa nas plantas hospedeiras.

Conforme estudos de Bari e Jones (2008), fica evidenciado que aplicações exógenas de fitormônios modulam respostas de defesa em plantas. Os patógenos microbianos também desenvolveram capacidade de manipular a rede reguladora relacionada à defesa de plantas produzindo fito-hormônios. Isso resulta em desequilíbrio hormonal e ativação de respostas de defesa inadequadas. Esta é uma das estratégias utilizadas por alguns patógenos para conferir virulência e causar doença.

Acevedo (2019), baseado no estudo de Bari e Jones (2008), hipotetiza que os fitohormônios presentes na saliva da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) poderiam induzir respostas de defesa nas plantas. Para confirmar, trataram plantas de tomate, milho e arroz com uma mistura de fito-hormônios. Como resultado, observam a indução de resposta nas atividades de polifenol oxidase (PPO), atividade de peroxidase (POX) e atividade de inibidor de protease (PI). Outro resultado obtido refere-se aos componentes salivares que modulam a resposta de defesa em diferentes plantas hospedeiras pela presença de efetores enzimáticos de defesa de plantas, fitormônios e outras moléculas de baixo peso molecular.

Saraiva (2018) relata em *M. spectabilis*, a detecção de fitormônios nas glândulas salivares quando os insetos foram submetidos a alimentação com capim - elefante cv Roxo-deBotucatu.

Portanto, podemos entender que os fitohormônios presentes na glândulas salivares de *M. spectabilis* poderiam modular respostas de defesa em plantas hospedeiras. Além de demonstrar a presença de fitormônios nas glândulas, a alimentação com diferentes forrageiras influenciou a concentração dos mesmos.

Os hormônios ACC, AJ e MeJa apresentaram comportamento similar nas glândulas salivares das cigarrinhas alimentadas com *B. brizantha* e *B. decumbens* (Figura 5B,5D e 5E). Estes resultados sugerem que o conteúdo de fitormônio na saliva desses insetos não parece influenciar as diferenças intraespecíficas da planta de indução de defesa. Acevedo (2018) relata que não há diferenças na presença desses hormônios em glândulas salivares de lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) quando alimentadas com diferentes variedades de milho.

As concentrações de ABA, AIA e zeatina apresentaram maiores concentrações em glândulas salivares de cigarrinhas alimentadas com *B. Brizantha* frente a *B. decumbens* (Figura 5A,5C e 5G). Recentemente, ABA e a zeatina surgiram como importantes reguladores de defesa (Schäfer et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Zhang et al., 2017). Alternativamente, insetos ou seus simbiontes associados podem ser capazes de sintetizar alguns hormônios como AIA e zeatina, hormônios que regulam o crescimento e divisão de células vegetais (Tanaka et al., 2014). O mosquito *Pontania sp.* é capaz para produzir AIA a partir de triptofano (Yamaguchi et al., 2012), mas a mariposa *Phyllonorycter blancardella* parece depender de bactérias endossimbióticas para a produção de citocininas (Kaiser et al., 2010).

A zeatina é um hormônio vegetal envolvido em várias interações bióticas de plantas e um aumento em suas concentrações é comumente observado após ataque de insetos ou patógenos, sugerindo que esse hormônio regula o metabolismo da planta e facilita a infestação (Giron et al., 2013; Zhang et al., 2017).

A concentração de AS foi maior na *B.decumbens* quando comparada a *B. brizantha* (Figura 5E). As quantidades de fitohormônios nas glândulas de *M. spectabilis* foram influenciadas pelo tipo de dieta na qual as cigarrinhas foram cultivadas. Maior quantidade de AS pode ter sido influenciada pela maior quantidade desse hormônio na planta ou até mesmo pela presença de microrganismo endossimbiontes. Jung et al. (2007) descrevem que a maior quantidade de AS encontradas em glândulas salivares de lagartas alimentadas com planta de arroz pode estar associada a um maior nível desse hormônio na planta.

As concentrações de ABA, AJ, AS e MeJa, não apresentaram diferenças em glândulas alimentadas com capim-elefante cv. Pioneiro e Roxo de Botucatu (Figura 5A, 5D, 5E e 5F). O ABA tem sido relatado no processo de sinalização induzindo respostas de defesa dependentes de JA em tecidos sistêmicos (Nguyen et al. 2016). JA, ACC, e SA são os fitohormônios mais associados à mediação de respostas de plantas a insetos (Hoysted et al., 2017). Os jasmonatos são os principais reguladores das respostas das plantas aos danos, patógenos necrotróficos e insetos herbívoros,

enquanto o etileno modula a magnitude das defesas diretas e indiretas das plantas produzidas em resposta aos jasmonatos (Schultz e Appel, 2004).

Schwartzberg and Tumlinson (2014), demonstram que em glândulas salivares do pulgão da ervilha (*Acyrtosiphon pisum*) alimentados com fava (*Vicia faba*) ocorre a regulação negativa para as respostas de defesa AJ. Esta supressão de defesa vegetal provavelmente parece ser mediada pelo AS presente na saliva do pulgão por indução da via do AS. Saraiva (2018) relata aumento de JA e uma redução de AS após 24 h de infestação. Decorrendo esse tempo houve uma inversão, com diminuição do JA e aumento do SA. Demonstrou-se que o SA se correlaciona negativamente com o acúmulo de JA (Nguyen et al., 2016) e onde o acúmulo de SA resulta em um feedback negativo reduzindo o acúmulo de JA. Já os hormônios ACC, AIA, e zeatina apresentaram concentrações maiores na cv Roxo de Botucatu em relação a cv Pioneiro (Figura 5B, 5C e 5G).

Com atividades diversas, as glândulas salivares funcionam como efetores podendo induzir ou suprimir as respostas de defesa das plantas por apresentarem atividades enzimáticas, melhorando assim o desempenho do herbívoro (Bos et al., 2010).

Há vários relatos acerca de efetores de herbívoros derivados de saliva, contudo, ainda permanecem pouco esclarecidos seus mecanismos funcionais e fisiológicos. A planta reconhece moléculas secretadas pelo organismo invasor e causa uma resposta defensiva. Entender os mecanismos de resistência das plantas ao ataque de insetos é fundamental para o desenvolvimento de novos genótipos por engenharia genética (Gatehouse, 2002; VanDoorn e De Vos, 2013).

Neste contexto, os compostos presentes na secreção oral de herbívoros desempenham um papel importante na interação entre a modulação planta-inseto e as vias de sinalização de defesa da planta. Baseados nos estudos de Hansen e Moran (2014), onde retratam respostas frente a ação de microrganismos, que associados a glândula salivar dos insetos podem facilitar o uso de plantas hospedeiras podendo ser responsáveis pela biossíntese de metabólitos e fitormônios, sugerimos então que insetos associados a microrganismos podem facilitar a infestação de plantas hospedeiras, e novas metodologias moleculares oferecem a possibilidade de elucidar tais papéis. Essa ação de microrganismos associados a glândulas salivar de insetos também foi sugerida por Saraiva (2018) em seus estudos.

Em resumo, nosso estudo mostrou que, além de efetores, as glândulas salivares de *M. spectabilis* contém compostos que modulam respostas de defesa em diferentes plantas. Identificamos, SA, JA e ABA e seus papéis na indução de defesa da planta. Nossas experiências indicam que esses hormônios suprimem as defesas induzidas por herbívoros em forrageiras. Não se

sabe se esses hormônios são sequestrados por esses insetos de sua dieta, ou são sintetizados por eles ou por seus simbiontes associados. Futuros experimentos visando elucidar estes mecanismos são necessários.

5. CONCLUSÃO

Diante do impacto que as cigarrinhas ocasionam na qualidade das forrageiras, é fundamental a compreensão de seu modo de ação bem como o seu comportamento na interação planta- inseto. Neste estudo identificamos as proteínas e os processos biológicos nas glândulas salivares de *M. spectabilis* submetidos a diferentes fontes de alimentação. O perfil proteico é alterado quando alimentadas com as forrageiras. O perfil de hormônios nas glândulas salivares também se mostrou alterado mas a sua origem ainda necessita ser elucidada. Sugerimos que a presença de microrganismos presentes nas glândulas possam produzir hormônios como forma de defesa. Assim, é fundamental a caracterização proteica e hormonal das glândulas salivares, bem como a caracterização molecular dos efetores e o entendimento das relações moleculares da interação *M. spectabilis* e das plantas hospedeiras para que seja possível elucidar o mecanismo de defesa da planta e desenvolver novos genótipos resistentes a insetos-praga.

6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta Praga (INCT-IPP), Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol, UFV), Embrapa Gado de Leite, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORN, H.T; JONES, T.H; STENHAGEN, G.S; TUMLINSON, J.H. **Identification and synthesis of volicitin and related components from beet armyworm oral secretions.** J Chem Ecol 26:203–220. 1005401814122, 2000.

ACEVEDO, F.E; RIVERA-VEJA, 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 26:80–86. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.029> ,2015.

ACEVEDO, F.E; PEIFFER M; RAY S; MEAGHER R; LUTHE, D.S, FELTON, G.W **Intraspecific differences in plant defense induction by fall armyworm strains.** New Phytol . 218:310–321. <https://doi.org/10.1111/nph.14981>,2018.

ACEVEDO, F. E.; SMITH, P.; PEIFFER, M.; HELMS, A.; TOOKER, J.; FELTON, G. W. 2019/06/20. **Phytohormones in Fall Armyworm Saliva Modulate Defense Responses in Plants.** Journal of Chemical Ecology. 15731561.<https://doi.org/10.1007/s10886-019-01079-z> ,2019.

ALJBORY, Z.A., CHEN, M.S., **Indirect plant defense against insect herbivores: a review.** Insect Sci. 25, 2-23. <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12436>, 2018.

ADAMS, B., et al., **A novel class of dual-family immunophilins.** Journal of Biological Chemistry, 280 (26): p. 24308-24314. 2005.

ALVARENGA, R.; AUAD, A. M.; MORAES, J. C; DA SILVA, S. E; RODRIGUES, B. S. **Tolerance to nymphs and adults of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) by forage plants in fertilized soils.** Pest. Manag. Sci. doi:10.1002/ps.5361, 2019.

ARGEL, M. et al. **A high- quality forage grass, resistant to spittlebugs and adapted to well-drained, acid tropical soils.** CIAT, 2007.

AGUIAR, D.M; AUAD, A.M; FONSECA MG; LEITE, M.V, **Brachiaria ruziense responses to different fertilization do see sand to the attack of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) nymphs and adults.** Sci WorldJ 2014:1–8 ,2014.

AMMAR E-D. **Ultrastructure of the salivary glands of the planthopper, *Peregrinus maidis* (ashmead) (Homoptera: Delphacidae).** International Journal of Insect Morphology and Embryology 15: 417–428, 1986.

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, A.S and FERREIRA, R.B, **Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens.** Pesqui Agropecu Bras 42: 1077-1081 2007.

BACKUS, E. A., M. RANGASAMY, M. STAMM, H. J. MCAUSLANE, and R. CHERRY. **Waveform library for chinch bugs (Hemiptera: Heteroptera: Blissidae): Characterization of electrical penetration graph waveforms at multiple input impedances.** Ann. Entomol. Soc. Am. 106: 524–539. 2013.

BARI, R., & JONES, J. D. G. **Role of plant hormones in plant defence responses.** *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–488. doi:10.1007/s11103-008-9435-0, 2008.

BENOIT, J.B; LOPEZ-MARTINEZ G; PATRICK, K.R, PHILLIPS, Z.P; KRAUSE, T.B, DENLINGER, D.L. **Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes.** *PNAS*. 108: 8026–8029. 2011.

BRAAKMAN, I; BULLEID, N.J., **Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum.** *Annual Review of Biochemistry* 80, pag 71–99. 2011.

BRUCE, T.J.A. **Interplay between insects and plants—dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds.** *J Exp Bot* 66:455– 465. 2015.

BINDEA, G; MLECNIK, B; HACKL, H; CHAROENTONG, P; TOSOLINI, M; KIRILOVSKY, A; FRIDMAN, W; PAGÈS, F; TRAJANOSKI, Z; GALON, J. **ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks.** *Bioinformatics*. 25(8): 1091–1093, 2009.

BRADFORD, M.M. **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. 1976.

BOS, J.I, PRINCE D; PITINO M; MAFFEI, M.E; WIN J; HOGENHOUT, S.A: **A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid).** *PLoS Genet*, 6:e1001216. 2010.

BUCHNER P; TAKAHASHI H; HAWKESFORD, M.J. **Plant sulphate transporters: coordination of uptake, intracellular and longdistance transport.** *Journal of Experimental Botany*, 55, 1765–1773. 2004.

CAETANO, F.H., ZARA, F.J., GREGO'RIO, E.A., **The origin of lipid droplets in the postpharyngeal gland of *Dinoponera australis* (Formicidae:Ponerinae).** *Cytologia*.67, 301–308. 2002.

CAROLAN JC, CARAGEA D, REARDON KT, MUTTI NS, DITTMER N, ET AL. **Predicted effector molecules in the salivary secretome of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*): A dual transcriptomic/proteomic approach.** *J Proteome Res* 10: 1505–1518. 2011.

CHISENHALL, DANIEL M. ET AL. **Effect of dengue-2 virus infection on protein expression in the salivary glands of *Aedes aegypti* mosquitoes.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 90, n. 3, p. 431-437, 2014a.

CHUMOVÁ, JANA AND KOUROVÁ, HANA AND TRÖGELOVÁ, LUCIE AND HALADA, PETR AND BINAROVÁ, PAVLA, **Microtubular and Nuclear Functions of γ -Tubulin: Are They LINCed.** *Cells*, v.8, 3,259, <https://www.mdpi.com/20734409/8/3/259> DOI.10.3390/cells8030259, 2019.

COUTINHO, F. S.; DOS SANTOS, D. S.; LIMA, L. L.; VITAL, C. E.; SANTOS, L. A.; PIMENTA, M. R.; DA SILVA, JOÃO CARLOS; RAMOS, J. R. L. S.; MEHTA, A.; FONTES, E. P. B.; RAMOS, H.J.O. **Mechanism of the drought tolerance of a transgenic soybean overexpressing the molecular chaperone BiP.** *Physiology and Molecular Biology of Plants*. - <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00643-x>, 2019.

CRAIG, E. A. **Hsp 70 at the membrane: driving protein translocation.** *BMC Biology*, 16(1). DOI: 10.1186/s12915-017-0474-3, 2018.

DEMANGEL, C.; HIGH, S. **Sec61 blockade by mycolactone: A central mechanism in Buruli ulcer disease.** *Biol. Cell*, 110: 237-248. doi:10.1111/boc.201800030, 2018.

DUSSOURD, D.E., PEIFFER, M., FELTON, G.W., **Chew and spit: tree-feeding notodontid caterpillars anoint girdles with saliva.** *Arthropod. Plant. Interact.* 10, 143–150, 2016.

DIAS-FILHO, M.B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação.** Ed. Ver. Atual e Ampliada. Belém, 2011.

ERB, M., MELDAU, S., HOWE, G.A. **Role of phytohormones in insect-specific plant reactions.** *Trends Plant Sci* 17:250–259. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.003>, 2012.

FORSLUND, K. et al. **Domain tree-based analysis of protein architecture evolution.** *Molecular Biology and Evolution*, Cary, v. 25, p. 254–264, 2008.

FRANCESCHINI, A., SZKLARCZYK, D., FRANKILD, S., et al.. STRING v9.1: **Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration.** *Nucleic Acids Res* 41, D808–D815, 2013.

GALAT, A., **Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity targets-functions.** *Current topics in medicinal chemistry*, 3 (12): p. 1315-1347. 2003.

GATEHOUSE, J.A., **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>. 2002.

GIRON, D., FRAGO, E., GLEVAREC, G., PIETERSE, C.M.J., DICKE, M., **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>. 2013.

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.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.006>, 2016.

HABIBI, J., T. A.; COURDON, E. A.; BACKUS, S. L.; BRANDT, R. M.; WAGNER, M. K.; WRIGHT, J. E.; **Morphology and histology of the alimentary canal of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Cimicomorpha: Miridae).** *Annals of the Entomological Society of America*, 101: 159-171. 2008.

HAI-JIAN, H., JIA-RONG, C., LEI CHEN, YU-XI, Z.; XIAO-YUE H., **Identification of Saliva Proteins of the Spider Mite *Tetranychus evansi* by Transcriptome and LC–MS/MS Analyses**, *PROTEOMICS*, 19, 4, 2019.

HALITSCHKE, R., SCHITTKO, U., POHNERT, G., BOLAND, W., BALDWIN, I.T; **Molecular Interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses**. *Plant Physiol* 125:711–717, 2001.

HANSEN, A.K., MORAN, N.A., **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>., 2014.

HINNEBUSCH, A.G.; **Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:434–67, 2014.

HOYSTED, G. A.; et al. **A Plant-Feeding Nematode Indirectly Increases the Fitness of an Aphid**. *Frontiers in plant science*, v. 8, 2017.

HOWE, G, JANDER, G. **Plant immunity to insect herbivores**. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:41–66. 2008.

HUFFAKER, A. et al. **Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 14, p. 5707-5712, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- **IBGE**. Acesso em Maio de 2019.

JANK, LIANA & BARRIOS, SANZIO & VALLE, CACILDA & SIMEÃO, ROSANGELA & ALVES, GEOVANI, **The value of improved pastures to Brazilian beef production**. *Crop and Pasture Science*. 65. 1132-1137. 10.1071/CP13319, 2014.

J. C. CAROLAN, D. CARAGEA, K. T. REARDON, N. S. MUTTI, N. DITTMER, K. PAPPAN, F. CUI, M. CASTANETO, J. POULAIN, C. DOSSAT, D. TAGU, J. C. REESE, G. R. REECK, T. L. WILKINSON, O. R. EDWARDS, **Predicted Effector Molecules in the Salivary Secretome of the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*): A Dual Transcriptomic/Proteomic Approach** *J. Proteome. Res.*, 10, 1505. 2011.

JUNG, C.; LYOU, S.H., YEU, S., KIM, M.A., RHEE, S., KIM, M., et al. **Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana***. *Plant Cell Rep*; 26:1053–63. 2007.

JURAND, A., PAVAN, C., **Ultrastructural aspects of histolytic process in the salivary glands cells during metamorphic stages in *Rhunchosciara hollaenderi* (Diptera, Sciaridae)**. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, *Cell Differentiation*,4, 219–236. 1975.

KAHVEJIAN, A, SVITKIN, Y.V, SUKARIEH, R.; M'BOUTCHOU, M.N., SONENBERG, N., **"Mammalian poly (A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms"**. *Genes Dev.* 19 (1): 104–13. doi:10.1101/gad.1262905. PMC 540229. PMID 15630022. 2005.

KAISER, W., HUGUET, E., CASAS, J., COMMIN, C. & GIRON, D. **Plantgreen-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterialsymbionts**. *Proceedings of the Royal Society of London, series B*, 227, 2311–2319, 2010.

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

KNOBLAUCH, M., NOLL, G.A, MU'LLER, T., PRU'FER, D., SCHNEIDER-HUTHER, I., et al. **ATP-independent contractile proteins from plants**. *Nat Mater* 2: 600–603, 2003.

KHASHAYAR, A., FITSUM, F. D., HAMED, S., NAJAFABADI, E.B., PIERRE THIBAUT, T., REZA, S., JACQUELINE, C. B., **Insights into the insect salivary gland proteome: Diet-associated changes in caterpillar labial salivary proteins**, *Journal of Insect Physiology*, Volume 59, Issue 3, Pages 351366, 2013.

LAEMMLI, U.K.; **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, 227:680-685. 1970.

LANG, S., PFEFFER, S., LEE, P.H., CAVALIE, A., HELMS, V., FORSTER, F. ZIMMERMANN, R. **An update on Sec61 channel functions, mechanisms, and related diseases**. *Front. Physiol.* 8, 887, 2017.

LU, Z.C, WAN, F.H. **Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in Bemisia tabaci (Gennadius)**. *J. Exp. Biol.* 214:764–769. 2010.

LUCAS, P. W.; TURNER, I. M.; DOMINY, N. J.; YAMASHITA, N. **Mechanical Defences to Herbivory**. *Annals of Botany*, v. 86, p. 913-920, 2000.

ZHANG, K., HENDRIE, C., LIANG, C., LI, M., DOHERTY-KIRBY, A., LAJOIE, G. **PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry**. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17:2337-2342. 2003.

MCCLOUGHLIN, F., BASHA, E; FOWLER, M.E., KIM, M., BORDOWITZ, J., KATIYAR-AGARWAL, S., et al. **Class I and II small heat-shock proteins protect protein translation factors during heat stress**. *Plant Physiol.* 172:16.00536. 2016.

MORI, N., YOSHINAGA, N., SAWADA, Y., FUKUI, M., SHIMODA, M, FUJISAKI, K., NISHIDA, R., KUWAHARA, Y. **Identification of volicitin-related compounds from the regurgitant of lepidopteran caterpillars**. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1168–1171. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1168> ,2003.

MARION, J.C. **Contabilidade Rural: contabilidade agrícola, contabilidade da pecuária, imposto de renda**. v.13. ed. São Paulo: Atlas, 2012.

- MARTINS, C.E., F. DERESZ, L. L., **Produção intensiva de leite em pasto de capim-elefante.** *Informações Agronômicas*, 62: 1-4. 1993.
- MERRET, R., CARPENIER, M.C., FAVORY, J.J., PICART, C., DESCOMBIN, J., BOUSQUET ANTONELLI, C., et al. **Heat-shock protein HSP101 affects the release of ribosomal protein mRNAs for recovery after heat shock.** *Plant Physiol.* 174:1216– 25. 2017.
- MITTLER, R. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Trends Plant Sci.*7: 405–10. 2002.
- MUKHTAR, I., MUJEEBAT, I., FADAHUNSI, A., DIVINE, M. S., **Cyclophilins: The Structure and Functions of an Important Peptidyl-prolyl Isomerase.** *Biochemistry and Molecular Biology.* Vol. 4, No. 1, pp. 1-6. Doi: 10.11648/j.ijbbmb.20180401.11 2019.
- NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. **Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis.** *Electrophoresis*, 6: p. 427-448, 1985.
- NGUYEN, D.U.Y., et al. **Drought and flooding have distinct effects on herbivore-induced responses and resistance in *Solanum dulcamara*.** *Plant, cell & environment*, v. 39, n. 7, p. 1485-1499, 2016.
- NUNES, P.H., CAMARGO-MATHIAS, M.I., **Glândulas salivares da cigarrinha-da-cana *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854),** Estudo Morfo-Histológico e Dosagem de Proteínas, 18 e 28 relatórios da FAPESP. 2001. Bolsa de Iniciação Científica, processo n8 00/08355-2 2001.
- OLIVEIRA-NETO, O. B., J. A. N. BATISTA, D. J. RIGDEN, O. L. FRANCO, R. FALCAO, R. R. FRAGOSO, L. V. MELLO, R. C. DOS SANTOS & M. F. GROSSI-DE-SA, **Molecular cloning of α - amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance.** *Journal of Protein Chemistry*, 22: 77-87. 2003.
- PAN X, ZHU B, ZHU H, CHEN Y, TIAN H, LUO Y, et al. **iTRAQ protein profile analysis of tomato green-ripe mutant reveals new aspects critical for fruit ripening.** *J Proteome Res.*;13:1979, 2014.
- NUNES, P.H., CAMARGO-MATHIAS, M.I., **Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Euhemiptera: Cercopidae),** *Micron*, Volume 37, Issue 1, Pages 57-66, 2006.
- PEIFFER, M., FELTON, G.W., **The host plant as a factor in the synthesis and secretion of salivary glucose oxidase in larval *Helicoverpa zea*.** *Arch. Insect Biochem. Physiol.*.58, 106–113. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.20034>. 2005.
- PENG RH, QIU J, TIAN YS, GAO J, HAN H, FU XY, et al. **Disulfide isomerase-like protein AtPdil1–2 is a good candidate for trichlorophenol phyto detoxification.** *Sci Rep* ;7:40130, 2017.
- PENG, J.; LI, Z.; YANG, Y.; WANG, P.; ZHOU, X.; ZHAO, T.; GUO, M.; MENG, M.; ZHANG, T.; QIAN, W.; XIA, Q.; CHENG, D.; ZHAO, P. **Comparative Transcriptome Analysis Provides Novel Insight into Morphologic and Metabolic Changes in the Fat Body during Silkworm Metamorphosis.** *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3525. 2018.

POHNERT, G., JUNG, V., HAUKIOJA, E., LEMPA, K., BOLAND, W., **New fatty acid amides from regurgitant of lepidopteran (Noctuidae, Geometridae) caterpillars.** *Tetrahedron* 5:11275–11280. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00639-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00639-0), 1999.

PRAKASH, A., SHIN, J., RAJAN, S., YOON, H.S., **Structural basis of nucleic acid recognition by FK506-binding protein 25 (FKBP25), a nuclear immunophilin.** *Nucleic Acids Res.*;44(6):2909–25. 2016.

PULIDO, P., et al, **Concepcion M. Both Hsp70 chaperone and Clp protease plastidial systems are required for protection against oxidative stress.** *Plant Signal Behav.*12:e1290039, 2017.

RAKHI, D., MANISH, K., AJEET, K. M., GOURAV, D.; JAYSHREE, A., **Mosquito Borne Diseases and Omics: Salivary Gland Proteome of the Female Aedes aegypti Mosquito.** *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 21:1, 45-54,2017.

RATZKA, A., VOGEL, H., KLIEBENSTEIN, D.J., MITCHELL-OLDS, T., KROYMANN, J., **Disarming the mustard oil bomb.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11223–11228, 2002.

RIBEIRO, J.M.C., ARCA, B., LOMBARDO, F., CALVO E, PHAN, V.M., CHANDRA, P.K., WIKEL, K., **An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Aedes aegypti.** *BMC Genomics*; 8:6. [PubMed: 17204158] 2007.

RESENDE, T.T., AUAD, A.M., FONSECA, M.G., **How many adults of Mahanarva spectabilis (Hemiptera: Cercopidae) should be used for screening Brachiaria ruziziensis (Poales: Poaceae) resistance?** *JEconEntomol* 107:396–402, 2014.

ROMA, G.C., CAMARGO-MATHIAS, M.I., ARRIGONI, E.B., MARIN-MORALES, M.A., **Little cicada of sugar cane Mahanarva posticata (Homoptera:Cercopidae).** A brazilian agricultural pest. Morpho-histological study of salivary glands. *Cytologia* 68, 101–114. 2003.

ROUX, SJ, STEINEBRUNNER, I. **Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants.** *Trends Plant Sci* 12: 522–527, 2007.

SARAIVA, N.B, **Interação cigarrinha-das-pastagens (Mahanarva spectabilis) e capimelefante: análise proteômica dos ovos e efetores em glândulas salivares.** Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p.58. 2018.

SCHÄFER, M., MEZA-CANALES, I.D., NAVARRO-QUEZADA, A., BRÜTTING, C., VANKOVÁ, R., BALDWIN, I.T., MELDAU, S. **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>, 2015.

SCHWARTZBERG, E.G., TUMLINSON, J.H., **Aphid honeydew alters plant defence responses.** *Funct. Ecol.* 28, 386–394. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12182>. 2014.

SCOT, R., et al., **Signaling Pathways and Molecular Mechanisms through which Branched-Chain Amino Acids Mediate Translational Control of Protein Synthesis,** *The Journal of Nutrition*, Volume 136, Issue 1, Pages 227S–231S, <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.227S>, 2006.

- SCHOONHOVEN, L.M. et al. **Insect-plant biology**. Oxford University Press on Demand, 2005.
- SHARMA, A., KHAN, A.N., SUBRAHMANYAM, S., RAMAN, A., TAYLOR, G.S., FLETCHER, M.J. **Salivary proteins of plant-feeding hemipteroids – implication in phytophagy**. *Bull. Entomol. Res.* 104, 117–136. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485313000618>. 2014.
- SHANNON, P., MARKIEL, A., OZIER, O., BALIGA, N.S., WANG, J.T., RAMAGE, D., AMIN, N., SCHWIKOWSKI, B., IDEKER, T., **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks**. *Genome Res.* 13(11):2498-504, 2003.
- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J.V., MANN, M. **In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes**. *Nature* 1: 2856 - 2860, 2006.
- SHINYA, T., HOJO, Y., DESAKI, Y., CHRISTELLER, J.T., OKADA, K., SHIBUYA, N., GALIS, I., 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>, 2016.
- SILVA, S.E.B., AUAD, A.M., MORAES, J.C., ALVARENGA, R., CLAUDINO, S.S., RESENDE, T.T., **Biological performance and preference of Mahanarva spectabilis (Hemiptera: Cercopidae) for feeding on different forage plants**. *J Econ Entomol* 110:1877-1885, 2017.
- SMITH, J.A., A.S. ACKERMAN, E.J. JENSEN, O.B. TOON. **Role of deep convection in establishing the isotopic composition of water vapor in the tropical transition layer**. *Geophys. Res. Lett.*, **33**, L06812, doi: 10.1029/2005GL024078. 2006.
- SMITH, R.W., BLEE, T.K, GRAY, N.K., **Poly (A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans**. *Biochem Soc Trans* 42: 1229–1237, 2014.
- SUZUKI, H., YOKOKURA, J., ITO, T., ARAI, R., YOKOYAMA, C., TOSHIMA, H., NAGATA, S., ASAMI, T., SUZUKI, Y., **Biosynthetic pathway of the phytohormone auxin in insects and screening of its inhibitors**. *Insect Biochem Mol Biol* **53:66–72**. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.07.008> ,2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E., **Metabólitos Secundários e Defesa Vegetal**. p.369-400. In: *Fisiologia Vegetal*. TAIZ, L.; ZEIGER, E. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 954p. 2013.
- TANAKA, K., CHOI, J., CAO, Y., STACEY, G., **Extracellular ATP acts as a damageassociated molecular pattern (DAMP) signal in plants**. *Front. Plant Sci.*3, 5446 10.3389/fpls.2014.00446. 2014.
- TSAI, J.H., PERRIER, J.L., **Morphology of digestive and reproductive systems of *Dalbulus maidis* and *Graminella nigrifrons* (Homoptera: Cicadelidae)**, Florida. *Entomologist*.79, 563–570. 1996.
- TUMLINSON, J.H., ENGELBERTH, J., **Fatty acid-derived signals that induce or regulate plant defenses against herbivory**. In: Schaller A (ed) *Induced plant resistance to herbivory*. Springer, Netherlands, pp 389–407, 2008.

- VALÉRIO, J.R. et al. **Spittlebugs: bioecology, host plant resistance and advances in IPM**. In: Proceedings of the XIX International Grassland Congress. FEALQ, Piracicaba, p. 217–221, 2001.
- VALÉRIO, J.R., Manejo de insetos-praga, pp. 317-331. In R.A. Reis, T.F. Bernardes and G.R. Siqueira (eds.), **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Multipress.2013.
- VAN DOORN, A., DE VOS M., **Resistance to sap-sucking insects in modern-day agriculture**. Front Plant Sci.4, 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00222>. 2013.
- ZARATE, S.I., KEMPEMA, L.A., WALLING, L.L., **Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses**. Plant Physiol 143:866– 875. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090035>, 2007.
- ZEBELO, S.A., MAFFEI, M.E., **Role of early signalling events in plant–insect interactions**. J. Exp. Bot. 66, 435–448. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru480>, 2015.
- 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. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702099>, 2017.
- ZIMMERMANN, R., EYRISCH, S., AHMAD, M., & HELMS, V. **Protein translocation across the ER membrane**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, (2011).1808(3), 912–924.[doi:10.1016/j.bbamem.06.015](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.06.015). 2010.
- YAMAGUCHI, K., MATSUMOTO, H., OCHIAI, M., TSUZUKI, S., HAYAKAWA, Y., **Enhanced expression of stress-responsive cytokine-like gene retards insect larval growth**. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 183e192. 2012.
- YANG, N., WEN, X., XIN, Y., WANG, S., WU, Q., LI, R., PAN, H.P., et al. **Transcriptomic and proteomic responses of sweetpotato whitefly, Bemisia tabaci, to thiamethoxam**. PLoS One.8:e61820. 2013
- YOSHINAGA, N., ABOSHI, T., ISHIKAWA, C., FUKUI, M., SHIMODA, M., NISHIDA, R., LAIT, C.G., TUMLINSON, J.H., MORI, N., **Fatty acid amides, previously identified in caterpillars, found in the cricket Teleogryllus taiwanemma and fruit fly Drosophila melanogaster larvae**. J Chem Ecol 33:1376–1381.<https://doi.org/10.1007/s10886-007-9321-2>, 2007.
- YOSHINAGA, N., ISHIKAWA, C., SEIDL-ADAMS, I., BOSAK, E., ABOSHI, T., TUMLINSON J.H, MORI, N. **N-(18-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine: a newly discovered analog of volicitin in Manduca sexta and its elicitor activity in plants**. J Chem Ecol 40:484– 490. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0436-y>,2014.
- WILL, T., K. STECKBAUER, M. HARDT, AND A. J. VAN BEL. **Aphid gel saliva: sheath structure, protein composition and secretory dependence on stylet-tip milieu**. PLoS ONE 7: e46903, 2012.
- WILL, T., **Function of Aphid Saliva in Aphid-Plant Interaction**. In: Biology and Ecology of Aphids... p. 221. 2016.

WU, P., SHANG, Q., HUANG, H., ZHANG, S., ZHONG, J., HOU, Q., & GUO, X.

Quantitative proteomics analysis provides insight into the biological role of Hsp90 in BmNPV infection in *Bombyx mori*. *Journal of Proteomics*, 103379. doi:10.1016/j.jprot.2019.103379, 2019.

WU, X., YAN, J., WU, Y., ZHANG, H., MO, S., XU, X., DING, H. **Proteomic analysis by iTRAQ-PRM provides integrated insight into mechanisms of resistance in pepper to *Bemisia tabaci* (*Gennadius*).** *BMC Plant Biology*, 19(1). doi:10.1186/s12870-0191849-0, 2019.

Capítulo II

**Respostas metabólicas em folhas de diferentes forrageiras infestadas
por *Mahanarva spectabilis***

RESUMO

As áreas de pastagens são de suma importância para a economia do país, visto que está diretamente relacionada a produção animal. O Brasil ocupa lugar de destaque frente a produção e exportação de produtos de origem animal. Entretanto, a grande área cultivada está constantemente exposta ao ataque de insetos-praga o que vai em detrimento a produtividade e a qualidade das forrageiras. Um exemplo muito comum de praga são as cigarrinhas -das-pastagens, em destaque a *Mahanarva spectabilis* que é considerada uma das principais pragas das pastagens na América Tropical. O plano de manejo integrado de pragas no Brasil inclui o desenvolvimento de variedades resistentes e produtivas por melhoramento genético. Diante da importância econômica das pastagens justifica-se o estudos afim de desenvolver cultivares cada vez mais resistente ao ataque de pragas. Entretanto os mecanismos de resistências nos genótipos ainda não são bem elucidados, e para que possamos fazer uma avaliação da resposta global das plantas a diferentes tipos de estresses que possam ser aplicados na interação planta-inseto, lançamos mão de ferramentas da biologia molecular como a metabolômica. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar os metabólitos secundários de *Brachairia brizantha* (resistente a cigarrinha), *Brachiaria decumbens* (susceptível), capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu (susceptível) e cv. Pioneiro (resistente) quando expostas ao ataque da *M. spectabilis*. Para isso, as plantas foram expostas ao ataque da cigarrinha por um período de 7 (sete) dias. As respostas metabômicas foram analisadas por técnicas de espectrometria de massas- QTof (Quadropole Time of Fligth Mass Espectomotry). As análises de metabólitos indicaram diferenças entre alguns compostos intermediários das vias de defesa nas diferentes variedades de forrageiras avaliadas. Alguns desses metabólitos secundários tem sido relatados como agentes de efeito negativo na biologia dos insetos herbívoros.

Palavras chave: Cigarrinha-das-pastagens. Genótipos. Defesa. Metabolômica.

1. INTRODUÇÃO

As pastagens cultivadas representam o mais importante recurso forrageiro para a alimentação dos rebanhos bovinos (Pereira, 2013). O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, porém ainda possui baixos índices de produtividade relacionados com perdas na qualidade das pastagens. As causas mais comumente associadas a perda de qualidade forrageira são: ausência ou uso inadequado de adubação de manutenção, ocorrência de pragas, doenças e plantas invasoras, excesso de lotação animal/área de pastejo e incompatibilidade de espécies forrageiras consorciadas. A utilização de pastagens para a alimentação de ruminantes auxilia na diminuição dos custos de produção, aumentando a viabilidade da atividade (Orth et al., 2012).

Conforme Corrêa e Santos (2003), nas regiões de clima tropical e subtropical, há grande potencial de produção, com várias gramíneas forrageiras bem adaptadas, tais como as dos gêneros *Panicum* e *Brachiaria*, que, se bem manejadas, podem constituir o principal componente da dieta de ruminantes.

O equilíbrio entre produtividade e qualidade deve ser alcançado, visando assegurar os requerimentos nutricionais dos animais e garantindo, simultaneamente, a maximização da eficiência dos processos de produção, utilização e conversão da forragem produzida. Grandes áreas dessas pastagens estão predispostas ao ataque de insetos-pragas devido a fatores como grande extensão territorial e inviabilidade de controle químico (Costa et al., 2007).

Insetos-praga como as cigarrinhas-das-pastagens, *Mahanarva spectabilis*, constituem uma das principais pragas que afetam as pastagens tropicais, causando danos severos e irreversíveis a planta e diminuição considerável na produção das pastagens (Valério, 2009; Auad et al., 2010). Esses insetos têm merecido maior atenção, em face dos altos níveis populacionais, das ocorrências generalizadas e da severidade dos danos que causam.

Na tentativa de reduzir os danos causados pela presença dos herbívoros, as plantas apresentam formas de defesa que podem ser de forma direta ou indireta (Seo et al., 2001; Oh et al., 2014). As defesas indiretas frente ao ataque dos insetos, envolvem uma mistura de compostos voláteis que são liberados pelas plantas atacadas. Esses compostos possuem a capacidade de atrair os inimigos naturais dos herbívoros, assim podendo a planta prover alimentos para dar abrigo a estes, de forma que eles possam permanecer por mais tempo nela, melhorando a efetividade de defesa da planta (Arimura et al., 2009). Já as defesas diretas são mediadas por características da planta que são capazes de afetar a biologia do inseto como a presença de pelos, tricomas, espinhos e folhas mais espessas (Howe e Jander, 2008). Dentro da defesa direta ainda podem ocorrer a produção de aleloquímicos (compostos tóxicos) como os metabólitos secundários e proteínas (peptídeos,

inibidores de enzimas digestivas), terpenóides, alcalóides e antocianinas (fenóis e quinonas) (Smith e Clement, 2012). Segundo War et al. (2012) a presença desses compostos podem ter efeito repelente, tóxico ou antinutricionais nos herbívoros, o que podem ocasionar retardo no seu desenvolvimento ou até causar-lhes a morte.

De maneira geral é muito grande o número de insetos que atacam plantas, causando danos que influem negativamente no sucesso dos empreendimentos agrícolas. Caso medidas de controle mais eficientes não sejam tomadas, a tendência é aumentar, ao passo que a agricultura for ampliada, possibilitando uma seleção direcional para o aparecimento de novos patógenos, perda da resistência por parte dos hospedeiros, além da possibilidade da convivência dos insetos-praga com a planta diante dos vários processos de controle conhecidos (Sinomato et al., 2014).

Uma das maneiras de controlar uma determinada praga é através da resistência genética da planta-alvo, aliado a fatores ambientais, visto que um determinado inseto pode ser capaz de identificar e escolher os seus hospedeiros (Wang et al., 2015).

Oliveira (2014) descreve que para que possamos alcançar o conhecimento de fatores que regulam a resistência de plantas ao inseto é necessário primeiro o conhecimento da causa da resistência, para que possa adequar e planejar um esquema de seleção de genótipos em programas de melhoramento genético.

A resistência de plantas a insetos era utilizada mesmo antes da domesticação das plantas, quando plantas suscetíveis a artrópodes morriam sem deixar descendentes, havendo dessa forma seleção natural. (Smith, 2005).

A soma relativa de qualidades hereditárias possuídas pelas plantas que influenciam o resultado do grau de injúria que o inseto promove ao se alimentar da mesma é definida como resistência das plantas. Pode ser expressa por características morfológicas desfavoráveis ao inseto como a presença de tricomas ou substâncias não nutritivas sintetizadas pelas plantas como a finalidade de protegê-las (Valério, 2005).

O método de resistência de plantas a insetos, é o mais comumente indicado para o controle das cigarrinhas-das-pastagens, uma vez que é um método de baixo custo, facilmente adotado e assimilado pelo produtor, uma vez que oferece uma defesa incorporada geneticamente, proporcionando controle efetivo por meio da aquisição de sementes, além da redução da aplicação de inseticidas favorecendo assim os insetos benéficos e o controle biológico natural (Smith, 2005; Valério, 2005).

A metabolômica é uma abordagem promissora usada para entender os mecanismos biológicos existentes em um organismo. Os metabólitos são determinados em amostras biológicas (fluidos, células, tecidos, etc.) por comparação de grupos controle com grupos alterados, submetidos a diferentes terapias, diferentes níveis de estresse, modulação dietética ou promovidos por uma doença ou condição específica. Faz uso de técnicas analíticas sofisticadas e tratamento avançado de dados e análises estatísticas (Canuto et al., 2017).

Segundo Corrales et al. (2017), por meio da análise metabolômica é possível identificar e quantificar os compostos presentes em um organismo de forma a obter informações sobre as alterações e o acúmulo de metabólitos que foram induzidos por uma resposta fisiológica ou fenotípica com o objetivo de explorar o maior número de metabólitos que possam ser alterados. Fornece também informações importantes para a aplicação em biotecnologia de plantas, uma vez que é capaz de monitorar com detalhes o metabolismo das plantas expostas a diferentes tipos de estresse, impulsionando assim a produção agrícola (Viant et al., 2017).

Gómez (2018) descreve em trabalho com soja, o uso promissor da metabolômica em conjunto com a proteômica, a fim de elucidar efeito sob o ponto de vista bioquímico e fisiológico, do dano ocasionado pela mastigação da lagarta *A. gemmatilis* em plantas suscetíveis e resistentes, comparando respostas à herbivoria entre os cultivares.

Demais autores relatam a eficiência da metabolômica em seus estudos de respostas das plantas de soja a diferentes tipos de estresse, especialmente a seca (Das et al., 2017), ao estresse salino (Zhang, 2016), por excesso de água (Komatsu et al., 2014) e interação com organismos patógenos (Aliferis et al., 2014).

Estudos com soja é bem relatado na literatura, porém com espécies de gramíneas forrageiras os estudos são escassos. Assim, dentro desse contexto o objetivo foi estudar a alteração de composição de metabólitos secundários ocasionado pela presença da *M. spectabilis* em diferentes forrageiras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das plantas

Plantas de *Brachiaria brizantha* cv Marandu (BB) e *Brachiaria decumbens* cv Basilisk (BD) foram obtidas a partir de mudas cedidas pela Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, Minas Gerais. Já as plantas de *Cenchrus purpureus* cv. Pioneiro (PIO) e *Cenchrus purpureus* cv. Roxo de Botucatu (RX) foram obtidas de estacas oriundas de pastagens do campo experimental do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Tanto as mudas quanto as estacas, foram transplantadas para vasos contendo mistura de solo e substrato comercial Plantmax® na proporção (1:1; v/v). As plantas foram mantidas no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV). No total foram três repetições de cada cultivar, totalizando doze plantas. Os vasos utilizados eram padronizados com volume de 2 litros, com 3 plantas por vaso.

2.2 Infestação com *Mahanarva spectabilis*

As ninfas de *M. spectabilis* foram coletadas em áreas de cultivo do campo experimental José Henrique Bruschi – Unidade Experimental da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco, Minas Gerais. As cultivares de gramíneas forrageiras, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, *Cenchrus purpureus* cv. Pioneiro e *Cenchrus purpureus* cv. Roxo de Botucatu, foram cultivadas por um período de 30 dias em condições de temperatura e umidade controladas, sendo distribuídas entre três repetições biológicas. Após esse período, as plantas foram envolvidas com sacos de organza e cada vaso foi infestado com um total de sessenta ninfas. A coleta das folhas foi feita 7 (sete) dias após o início do experimento.

Para a coleta das folhas, foram selecionadas aquelas que apresentaram maiores danos visíveis ao ataque da cigarrinha, como início de amarelamento foliar e pequenas perfurações. Foram coletadas 4 (quatro) folhas de cada vaso. Após a coleta, as folhas foram acomodadas em embalagem de alumínio e imediatamente em nitrogênio líquido e acondicionadas em temperatura de -80 °C.

2.3 Extração de metabólitos e derivatização química para análises por LC/MS

Os extratos foliares foram preparados por maceração de 150 mg de folhas em nitrogênio líquido e para cada amostra foram adicionados 500 µl de solução extrativa (75% de metanol / 0,1% de ácido fórmico) (Gómez et al., 2018). Os tubos foram agitados por 20 segundos e centrifugados por 6.000 xg por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado usando uma membrana

de PVDF de 0,22 μm e 80 μL da solução foi transferida para um frasco. Em seguida, uma alíquota de 10 μL foi injetada para análise através de Cromatografia Nano Líquida - Espectrometria de Massas (nano LC-MS) utilizando o sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EUA), contendo coluna de captura e coluna capilar ProteCol GHQ303 C18 3,0 μm - 300 μm \times 150 mm, operando com vazão de 5,0 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.4 Análise do perfil metabólico

Os metabólitos eluídos foram injetados automaticamente no espectrômetro de massas micrQTOF QII (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), trabalhando no modo on-line, com o auxílio de uma agulha de ionização microESI. Este passo consistiu em soluções de fase móvel sendo utilizadas para o programa de gradiente como se segue: (A) água e 0,02% de ácido acético (v / v) e (B) acetonitrila e 0,02% de ácido acético (v / v). Utilizou-se o seguinte gradiente: uma rampa linear subindo a 5% aumentando para 50% (B) por 30 min, 50% (B) por 5 min, subida linear iniciando em 50% aumentando para 90% de (B) por 3 min, 90% (B) por 2 min, descenso gradiente linear iniciando em 90% diminuindo para 10% (B) por 3 min, seguido por manutenção constante a 10% (B) por 3 min. A varredura de íons para espectros MS1 em modo positivo foi realizada para massas entre 100 e 1000 m / z, e entre 50 e 1000 m / z para os espectros MS2. Os dados foram adquiridos ao longo de 46 min em cada análise LC-MS / MS, usando o software Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), e os espectros foram processados através do programa Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), usando as configurações padrão para metabolômica. O espectrômetro de massa foi operado no modo Auto-MSn, que coletou espectros de MS2 para os íons mais intensos em todo espectro de varredura. Os dados do espectro de massa bruta foram convertidos para o formato mzXML usando a ferramenta de conversão proteowizard usando o algoritmo de pico de separação (XCMS refe). Os picos de List também foram gerados no formato genérico de mascote (mgf) pelo programa Data Analysis

2.5 Processamento de dados e identificação dos metabólitos

Os dados brutos convertidos para m/z XML também foram usados para comparar o perfil LC / MS dos extratos foliares pela plataforma XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu>). Os alinhamentos foram realizados utilizando parâmetros padrão para o sistema HPLC / Qtof usando 20 ppm para MS1 e banco de dados de metabólitos para *Arabidopsis thaliana*. Foram utilizados métodos de pares e de grupo múltiplo para o contraste dos grupos de forrageiras avaliadas (infestadas ou não

infestadas) BB I x BB NI x BD I x BD NI e PIO I x PIO NI x RX I x RX NI. O módulo Multi-Omic foi utilizado para inferência de rotas contra banco de dados de metabólitos de *Arabidopsis thaliana*. Uma tabela de metabólitos contendo a intensidade de todos os íons detectados em todas as execuções foi exportada da plataforma XCMS e utilizada como entrada para análise estatística utilizando a plataforma de base Web MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Os filtros de qualidade baseados nos métodos de desvio padrão foram usados para remover automaticamente os dados de baixa qualidade. Em seguida, os valores de intensidade foram normalizados por mediana e os dados foram transformados pelo método de Pareto Scaling. Os dados foram analisados utilizando Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLSDA) para agrupar os tratamentos e para classificar os íons (escore VIP) em ordem de importância nas amostras. Análise de variância unidirecional (ANOVA) e *heatmaps* foram utilizados para visualizar os compostos com abundância diferencial.

3. RESULTADOS

Dados brutos de LC / MS convertidos foram utilizados para comparar os perfis de metabólitos entre os genótipos contrastantes e verificar a flutuação dos metabólitos presentes nas folhas não infestadas (NI) ou com infestação (I) por *M. spectabilis* de *B. brizantha*, *B. decumbens*, capim-elefante cv. Pioneiro e capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu. Após as correções de tempo de retenção (Figura 1), os cromatogramas de íons extraídos (XICs) foram utilizados para as comparações de m/z e intensidades entre os tratamentos.

O método PLSA-DA foi utilizado para analisar as amostras de acordo com as variáveis mais significativas e para o agrupamento diferencial dos genótipos contrastantes. Os perfis mostraram um comportamento geral distinto para os genótipos de *B. brizantha* x *B. decumbens* e capim-elefante cv. Pioneiro x cv. Roxo-de-Botucatu não infestadas (NI) ou com infestação (I) por possuírem diferentes bases genéticas (Figura 2). As respostas frente a presença das cigarrinhas mostrou uma influência no perfil de distribuição dos genótipos, exceto para o cv. Pioneiro, onde a presença ou ausência da cigarrinha não se fez relevante.

O método PLSDA também foi utilizado para indicar os metabólitos com presença mais significativa que seriam responsáveis pelo agrupamento das amostras (Figura 3). Assim, foi possível observar alguns íons com maiores abundâncias relativas sob infestação com a cigarrinha nos cultivares *B. brizantha* (M395T67, M369T20 e M396T67) e capim-elefante cv. Pioneiro (M447T35). A concentração relativa dos metabólitos é representada através da intensidade de coloração dos 'box', como apresentado na Figura 3. Coloração mais intensa de vermelho indica maior abundância do metabólito observado e coloração verde intensa representa menor quantidade. A diminuição na intensidade de cor refere-se também a diminuição do composto observado. Sugerimos que a presença dos compostos mais presentes possam estar ligados a resistência da planta ao ataque da cigarrinha.

Os principais compostos de LC/MS responsáveis pela discriminação entre grupos de forrageiras com ou sem infestação foram identificados pelo score VIP PLSDA.

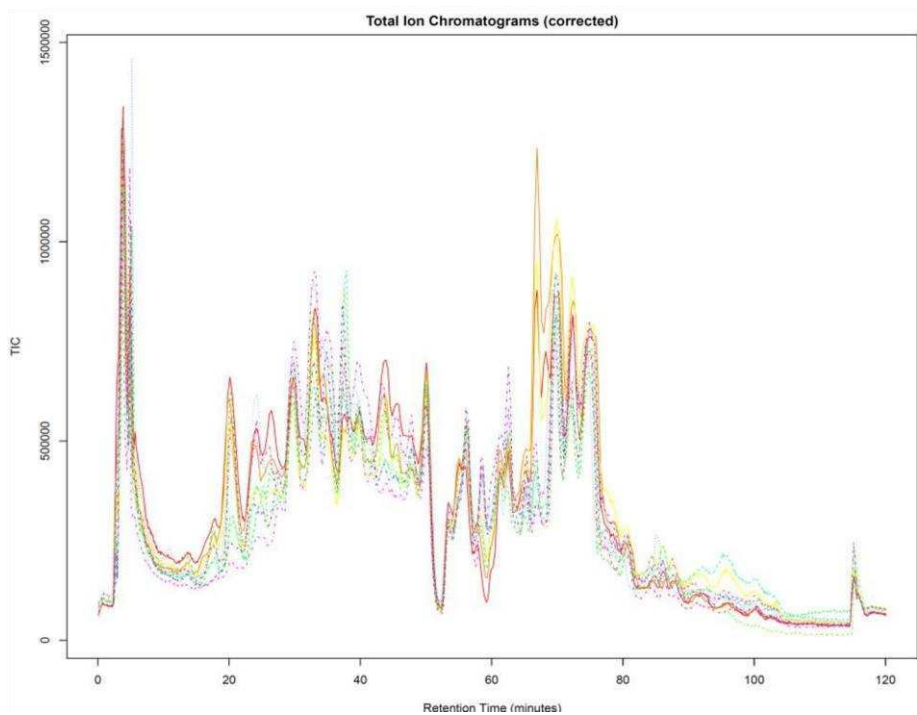
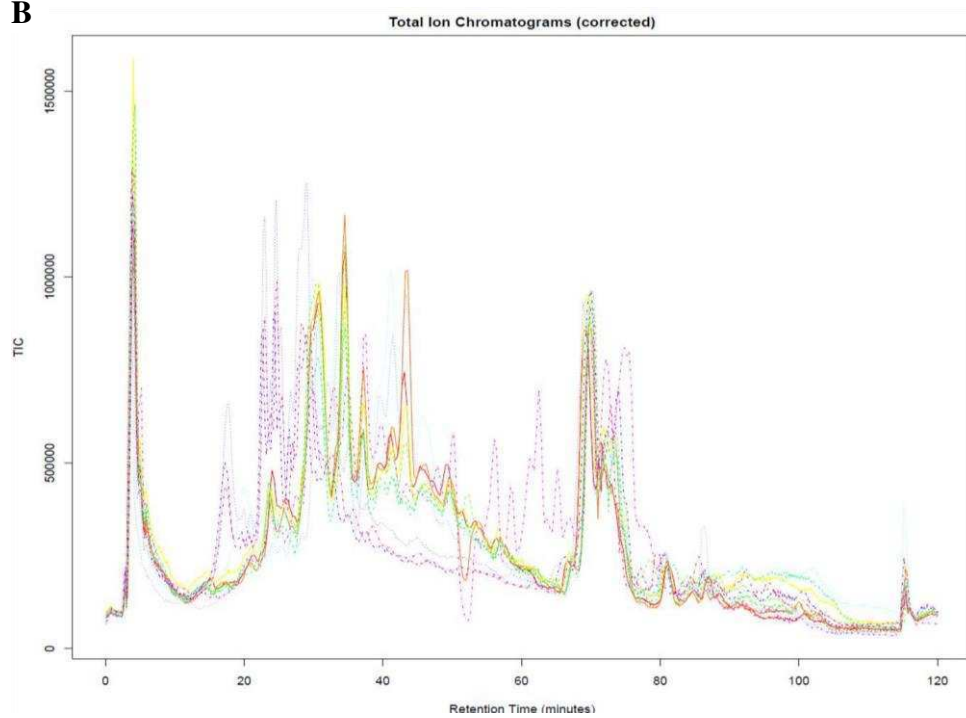
A**B**

Figura 1– TIC cromatograma de LC/MS após corrida usando XCMS e métodos de comparação por grupos de forrageiras. **A** - BB I x BB NI x BD I x BD NI, **B** - PIO I x PIO NI x RX I x RX NI.

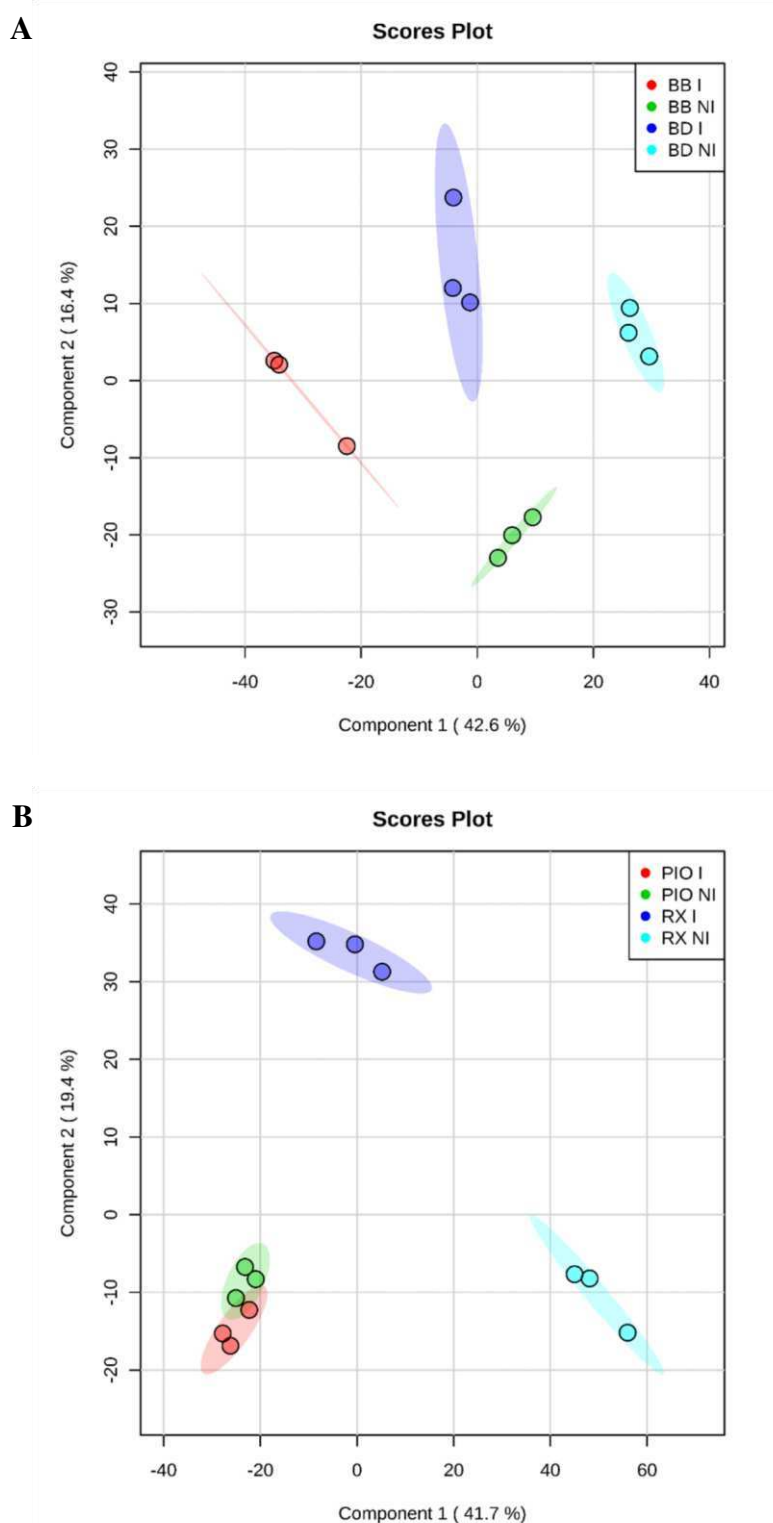


Figura 2 – Análise de agrupamento por PLSDA (Análise Discriminante dos Quadrados Mínimos Parciais) de perfis metabólicos de folhas não infestadas (NI) ou infestadas (I) por *Maharnarva spectabilis*. **A** - *B. brizantha* (BB) x *B. decumbens* (BD), **B** - Capim-elefante cv. Pioneiro (PIO) x Capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu (RX).

As análises de variância (ANOVA) e plotagem dos *heatmaps* foram utilizadas para verificar os metabólitos que apresentaram maiores abundâncias relativas nos genótipos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu e capim-elefante cv. Pioneiro (Figuras 4 e 5).

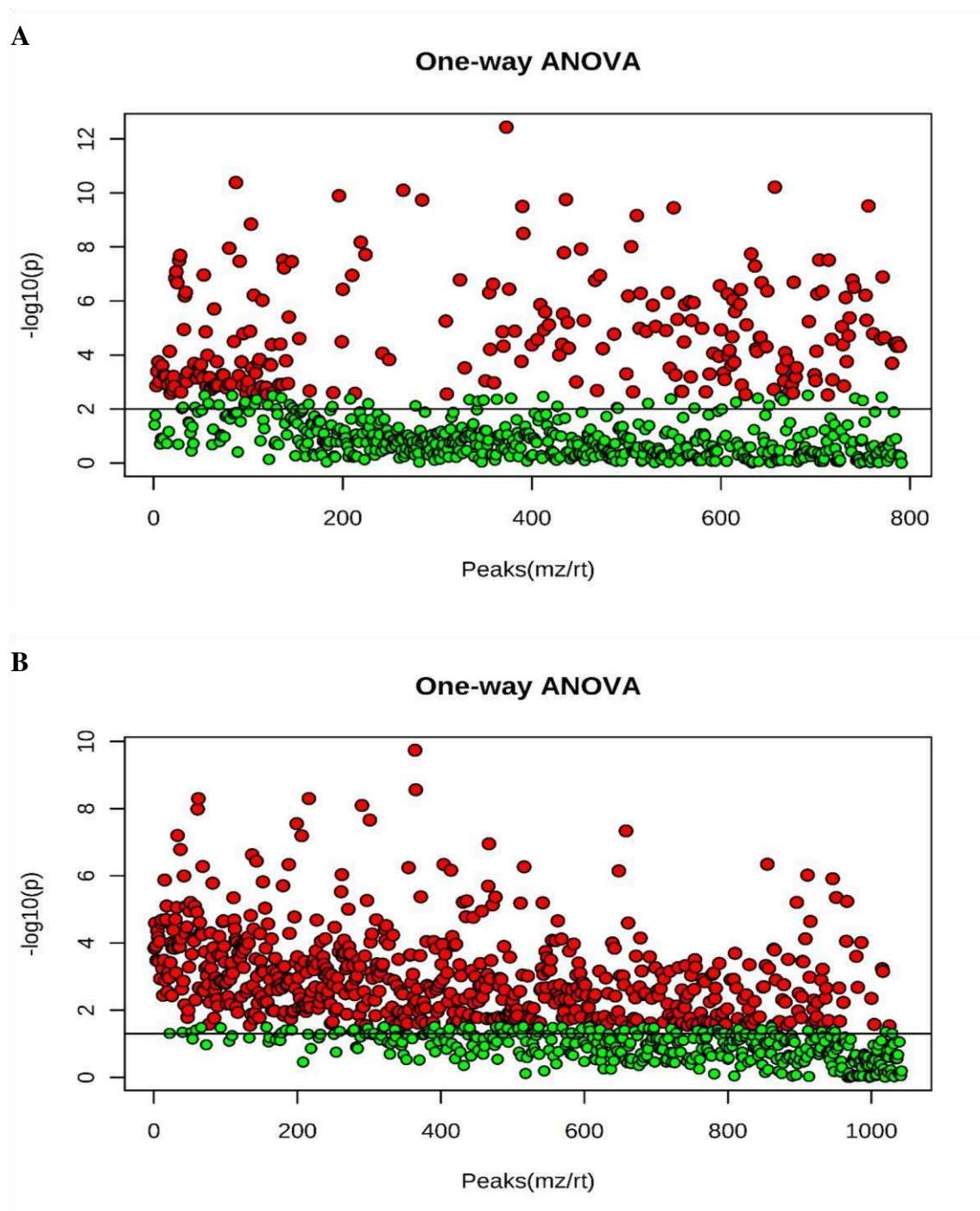


Figura 4 – Análise de variância (ANOVA) das intensidades dos XIC (cromatogramas de íons extraídos) geradas a partir dos perfis de LC/MS por XCMS das folhas infestadas (I) ou não infestadas (NI) por *M. spectabilis*. **A** – Capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu e capim-elefante cv. Pioneiro, **B** - *B. brizantha* e *B. decumbens*.

Observamos a presença de um conjunto de diferentes metabólitos com maior abundância nas folhas infestadas de *B. brizantha* em relação as folhas não infestadas (Figura 5A). Outro conjunto distinto foi observado nas folhas de *B. decumbens* não infestadas. O comportamento dos metabólitos nas cultivares de capim-elefante foi diferente em relação as Brachiarias, mostrando uma quantidade expressiva no cv. Roxo-de-Botucatu não infestado (Figura 5B). As abundâncias relativas normalizadas de alguns dos principais íons presentes em altas concentrações nas diferentes forrageiras resistentes ou não a herbivoria estão indicados na Figura 6.

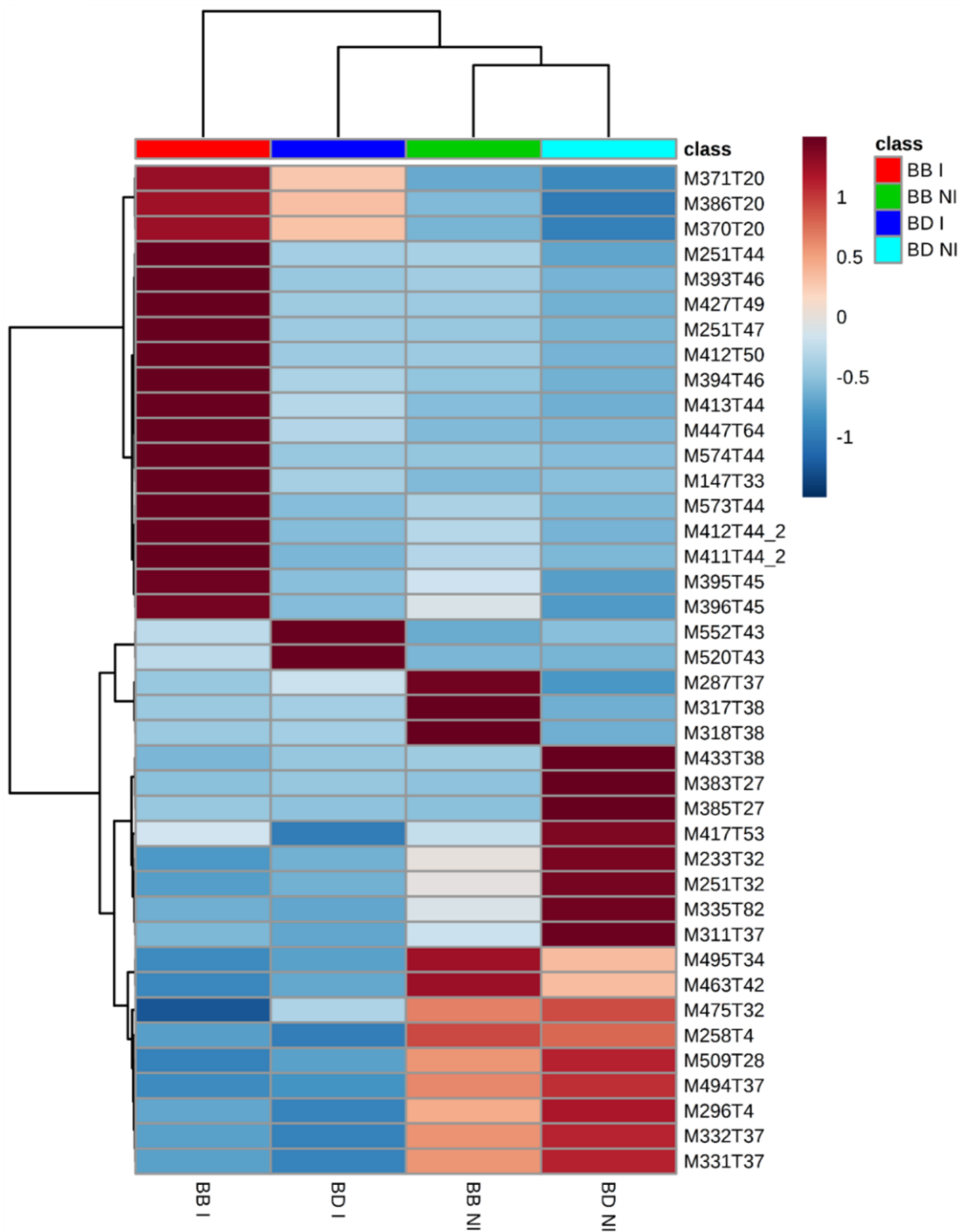


Figura 5 – Análise de agrupamento pelo método HeatMap dos metabólitos caracterizados nas folhas na presença (I) ou ausência (NI) da cigarrinha *M. spectabilis* em *B. brizantha* (BB) e *B. decumbens* (BD).

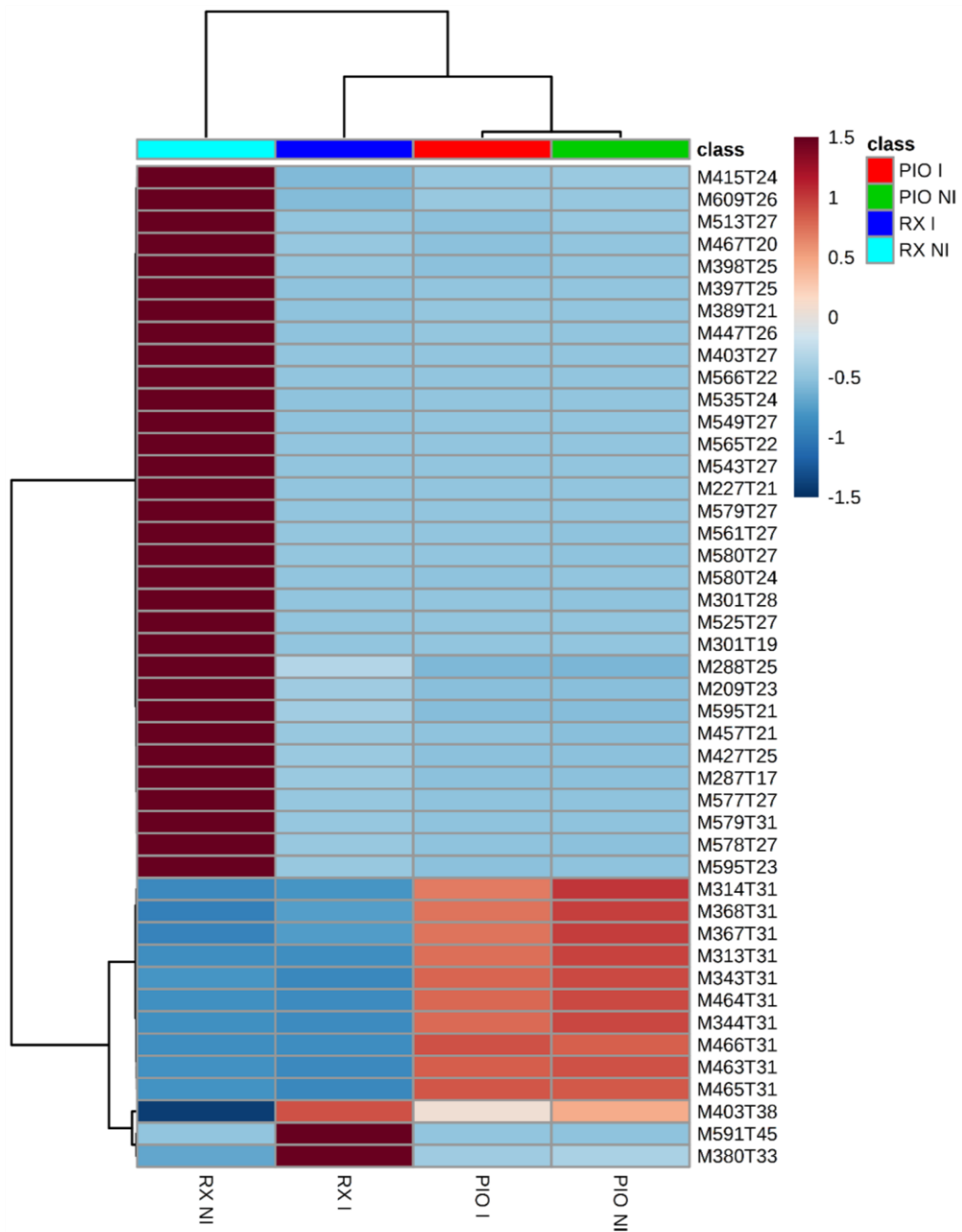


Figura 6 – Análise de agrupamento pelo método HeatMap dos metabólitos caracterizados nas folhas na presença (I) ou ausência (NI) da cigarrinha *M. spectabilis* em Capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu (RX) e cv. Pioneiro (PIO).

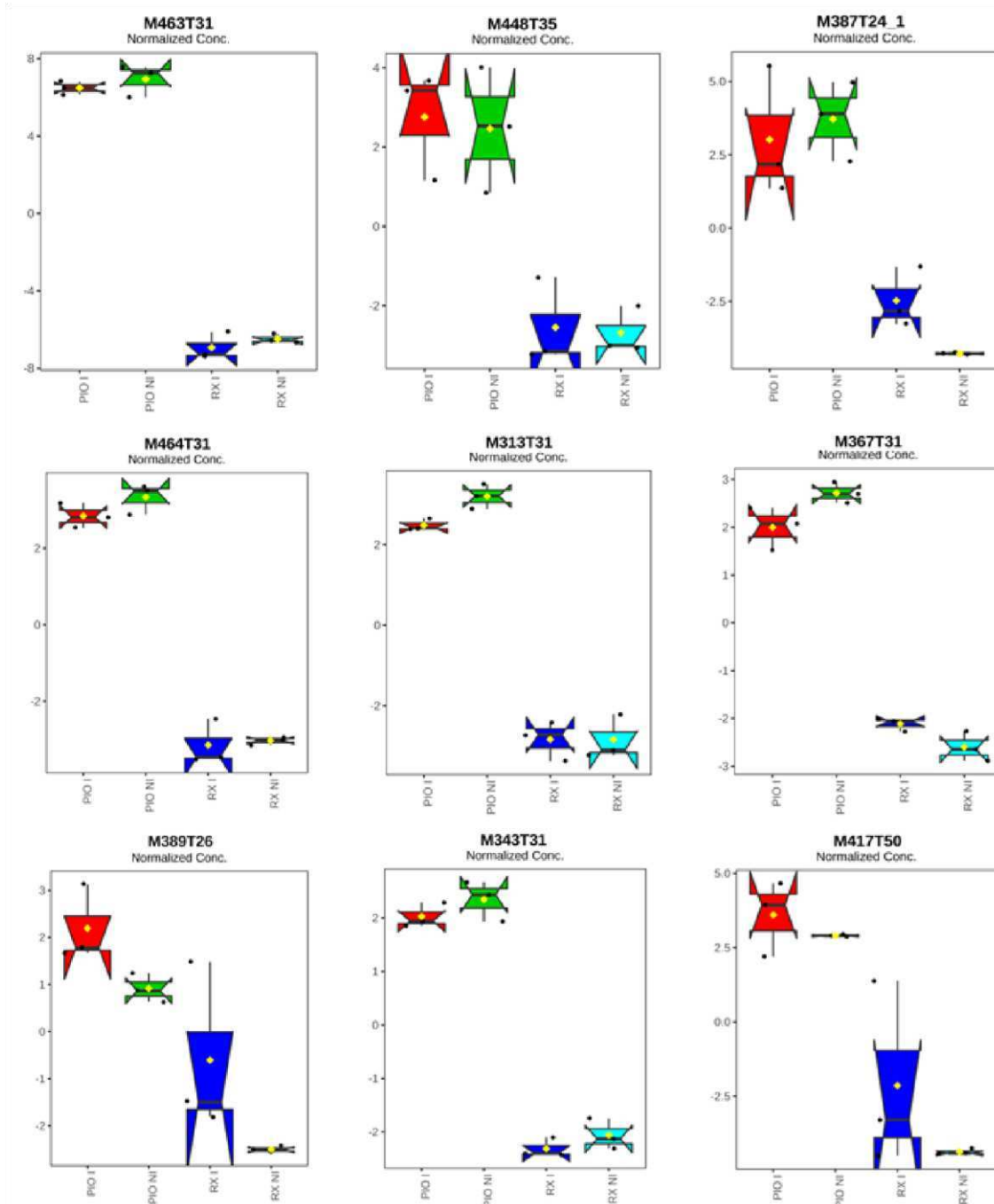


Figura 7 – Comparações por PLSDA das intensidades dos perfis metabólicos dos XIC (cromatogramas de íons extraídos) normalizados gerados a partir dos perfis de LC/MS por XCMS das folhas infestadas (I) ou não infestadas (NI) por *M. spectabilis* em capim-elefante cv. Roxo e capim-elefante cv. Pioneiro

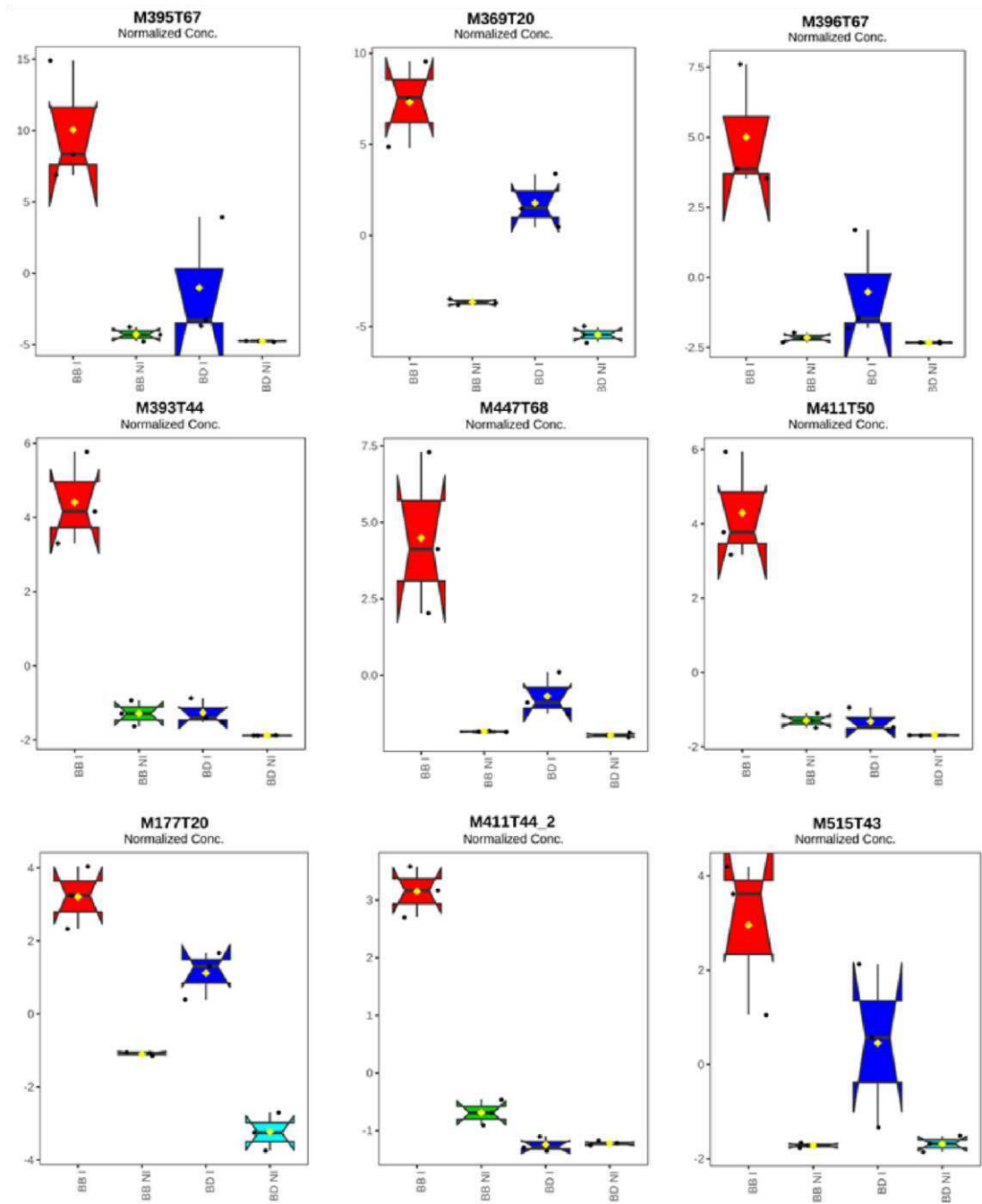


Figura 8 – Comparações por PLSDA das intensidades dos perfis metabólicos dos XIC (cromatogramas de íons extraídos) normalizados gerados a partir dos perfis de LC/MS por XCMS das folhas infestadas (I) ou não infestadas (NI) por *M. spectabilis* em *B. brizantha* e *B. decumbens*.

Através da análise funcional realizada pela plataforma XCMS, observamos que algumas vias metabólicas poderiam ser responsáveis à infestação de *M. spectabilis* nas diferentes forrageiras estudadas. Indicamos os supostos compostos específicos que poderiam estar relacionados à resistência. No capim-elefante cv. Pioneiro, identificamos os metabólitos

desregulados pertencentes às vias de biossíntese de fenilpropanóides, sanguinarine e glucosinolatos (Tabela 1). Vias relacionadas a cumarina, biossíntese de glucosinolatos e kaempferol foram reportados no capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu (Tabela 2).

Na *B. decumbens* observamos vias de glucosinolatos em relativa abundância porém oriundas de diferentes fontes de aminoácidos (Tabela 3), e na *B. brizantha* observamos via de biossíntese de ácido abscísico (Tabela 4).

Tabela 1 – Vias metabólicas caracterizadas pela plataforma XCMS de LC/MS mostrando compostos com abundâncias relativas alteradas nas folhas de capim-elefante cv. Pioneiro infestadas em relação às folhas não infestadas por *M. spectabilis*.

Pathway	Overlapping putative metabolites ¹	All metabolites ^{2*}	p-values
phenylpropanoid biosynthesis	4	7	6.5e-2
gibberellin inactivation I (2 β -hydroxylation)	3	8	1.4e-1
chlorogenic acid biosynthesis I	3	5	8.5e-2
glucosinolate biosynthesis from tetrahomomethionine	3	3	6.2e-2
glucosinolate biosynthesis from tryptophan	3	7	1.2e-1
ajugose biosynthesis II (galactinol-independent)	2	3	1.6e-1
sulfide oxidation III (sulfur dioxygenase)	2	3	1.6e-1
pyocyanin biosynthesis	2	3	1.6e-1
2,3-cis-flavanols biosynthesis	2	4	2.1e-1
monolignol glucosides biosynthesis	2	6	3.2e-1
sanguinarine and macarpine biosynthesis	2	10	5.5e-1
selenate reduction	2	2	1.2e-1
magnoflorine biosynthesis	2	3	1.6e-1
formaldehyde oxidation II (glutathione-dependent)	2	3	1.6e-1
salicylate biosynthesis I	2	2	1.0e+0
glutathione redox reactions II	2	2	1.2e-1
ferulate and sinapate biosynthesis	2	3	1.6e-1
phenolic malonylglucosides biosynthesis	2	5	1.0e+0
phaseic acid biosynthesis	2	2	1.0e+0
tyrosine biosynthesis II	2	2	1.0e+0
1,4-dihydroxy-2-naphthoate biosynthesis II (plants)	2	2	1.0e+0
sulfate reduction II (assimilatory)	2	2	1.2e-1
5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis II	2	3	1.0e+0

¹Número de metabólitos com abundâncias relativas alteradas nas vias metabólicas.

²Número total de metabólitos encontrados nas vias metabólicas.

Tabela 2 – Vias metabólicas caracterizadas pela plataforma XCMS de LC/MS mostrando compostos com abundâncias relativas alteradas nas folhas de capim-elefante cv. Roxo-de-Botucatu infestadas em relação às folhas não infestadas por *M. spectabilis*.

Pathway	Overlapping putative metabolites ¹	All metabolites ^{2*}	p-values
kaempferol glycoside biosynthesis (Arabidopsis)	3	7	4.2e-3
coumarin biosynthesis (via 2-coumarate)	2	3	1.0e+0
GA12 biosynthesis	2	3	6.9e-3
glucosinolate biosynthesis from pentahomomethionine	2	4	1.0e-2
phenolic malonylglucosides biosynthesis	2	5	1.0e+0
stachyose biosynthesis	2	4	1.0e-2

¹Número de metabólitos com abundâncias relativas alteradas nas vias metabólicas.

²Número total de metabólitos encontrados nas vias metabólicas.

Tabela 3 – Vias metabólicas caracterizadas pela plataforma XCMS de LC/MS mostrando compostos com abundâncias relativas alteradas nas folhas de *B. decumbens* infestadas em relação às folhas não infestadas por *M. spectabilis*.

Pathway	Overlapping putative metabolites ¹	All metabolites ^{2*}	p-values
glucosinolate biosynthesis from phenylalanine	4	6	4.5e-2
glucosinolate biosynthesis from tryptophan	4	8	4.7e-2
glucosinolate biosynthesis from hexahomomethionine	2	3	7.8e-2
glucosinolate biosynthesis from pentahomomethionine	2	3	7.8e-2
coniferin metabolismo	2	3	7.8e-2
caffeoylglucarate biosynthesis	2	3	7.8e-2
sucrose biosynthesis II	2	4	9.1e-2
coumarin biosynthesis (via 2-coumarate)	2	4	9.1e-2
sucrose degradation II (sucrose synthase)	2	4	9.1e-2
glucosinolate biosynthesis from trihomomethionine	2	4	9.1e-2
glucosinolate biosynthesis from tetrahomomethionine	2	5	1.1e-1
stachyose biosynthesis	2	5	1.1e-1
glucosinolate biosynthesis from homomethionine	2	5	1.1e-1
indole glucosinolate breakdown (insect chewing induced)	2	5	1.1e-1
indole glucosinolate breakdown (active in intact plant cell)	2	6	1.2e-1
anthocyanidin modification (Arabidopsis)	2	6	1.2e-1
sinapate ester biosynthesis	2	6	1.2e-1
phenolic malonylglucosides biosynthesis	2	7	1.4e-1
glucosinolate biosynthesis from dihomomethionine	2	9	1.8e-1
sanguinarine and macarpine biosynthesis	2	15	3.1e-1

¹Número de metabólitos com abundâncias relativas alteradas nas vias metabólicas.

²Número total de metabólitos encontrados nas vias metabólicas.

Tabela 4- Vias metabólicas caracterizadas pela plataforma XCMS de LC/MS mostrando compostos com abundâncias relativas alteradas nas folhas de *B. brizantha* infestadas em relação às folhas não infestadas por *M. spectabilis*.

Pathway	Overlapping putative metabolites ¹	All metabolites ^{2*}	p-values
abscisic acid glucose ester biosynthesis	2	3	5.6e-2
chlorophyllide a biosynthesis I (aerobic, light-dependent)	2	9	1.0e+0
flavin biosynthesis I (bacteria and plants)	1	5	1.0e+0
phaseic acid biosynthesis	1	4	1.0e+0
vitamin E biosynthesis (tocotrienols)	1	8	1.0e+0
tryptophan degradation VI (via tryptamine)	1	2	1.0e+0
flavonoid biosynthesis	1	4	1.0e+0
indole-3-acetate biosynthesis II	1	5	1.0e+0
abscisic acid biosynthesis	1	1	1.0e+0
suberin monomers biosynthesis	1	14	1.0e+0
5-deoxystrigol biosynthesis	1	4	1.0e+0
indole glucosinolate breakdown (insect chewing induced)	1	5	1.0e+0
ubiquinol-9 biosynthesis (eukaryotic)	1	5	1.0e+0
glucosinolate biosynthesis from trihomomethionine	1	6	1.0e+0

¹Número de metabólitos com abundâncias relativas alteradas nas vias metabólicas.

²Número total de metabólitos encontrados nas vias metabólicas.

4. DISCUSSÃO

A interação inseto-planta é complexa e dinâmica, envolvendo processos que ao longo do tempo produzem uma grande variação de características tanto para o inseto quanto para a planta, dentro de um sistema onde a resposta de um é sempre em função da ação ou reação do outro (Aoyama e Labinas, 2012).

Kant (2015) relata que algumas moléculas são utilizadas pelas plantas para resistirem a herbivoria, sendo que a quantidade e a intensidade da utilização das mesmas vai depender das interações induzidas pelos herbívoros. A função primordial dessas moléculas é promover o retardo no desenvolvimento e crescimento do herbívoro, o que geralmente ocorre por meio de interferência na alimentação, digestão e integridade intestinal.

Sabe-se que as defesas das plantas ocorrem tanto no tempo quanto no espaço por redes reguladoras altamente complexas que são moduladas por interações com outras vias de sinalização, nas quais as defesas podem ser constitutivas ou induzidas. Produzidas de forma induzida, essas moléculas podem ser tanto de natureza proteica como inibidores de proteases, peptidases, degradadoras de aminoácidos, ou oriundas do metabolismo secundário como os compostos fenólicos, isoterpenóides e compostos nitrogenados (Will et al., 2013).

Nos insetos sugadores, a composição da seiva do floema não só influencia na decisão do inseto de aceitar ou não um hospedeiro, como também determinará o seu crescimento e reprodução (Pritchard et al., 2007).

Estudos conduzidos por Panis et al. (2016) mostram que as plantas possuem a capacidade de sintetizar uma vasta gama de metabólitos secundários que são usados na defesa ao ataque de insetos fitófagos. Por outro lado, os insetos podem responder com contraadaptações para contornar as defesas químicas das plantas, como por exemplo, são capazes de desintoxicar ou até mesmo sequestrar toxinas produzidas pelas plantas e utilizá-las para se proteger dos inimigos naturais. O inseto *Dactylopius opuntiae*, por exemplo, produz o ácido cármico como mecanismo antimicrobiano e antipredatório (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

A separação de compostos de defesa é favorecida através do processo de extração metanólica. Esses compostos já foram descritos como sendo flavonóides (Gómez et al., 2018), alcalóides (Thanigaivel et al., 2017), terpenóides (Ahn et al., 1997; Muema et al., 2016) e glucosinolatos (Muema et al., 2016).

Diante da necessidade de maiores esclarecimentos acerca da resistência de alguns genótipos a *M. spectabilis*, estudos mais detalhados e aprofundados são necessários para esse entendimento, assim lançamos mão do uso das análises metabólicas para esse fim.

Existe uma grande variabilidade de tolerância e sensibilidade em diferentes espécies de plantas frente ao ataque de insetos herbívoros. Estudos de Lopes et al. (2009) com infestação com o *D. opuntiae* em palma forrageira, confirmam a presença de alguns flavonóides como a rotenona, rutina, quercetina e campferol, com efeito inseticida agindo de forma negativa no inseto, causando retardo no ciclo ou até mesmo a morte. A presença de glicosinolato foi descrito em plantas de pimenta (*Capsicum* spp) por Macel et al. (2019) com potencial ação de defesa química ao ataque de *Frankliniella occidentalis*. A emissão de metabólitos orgânicos voláteis (MOV's) pode ser observada em cana-de-açúcar frente ao ataque da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*). Os MOVs podem atrair inimigos naturais ou repelir a praga, afetando diretamente (Nalam & Nachappa, 2014). Os MOVs podem afetar diretamente a fisiologia e o comportamento dos herbívoros apresentando-se como tóxicos (antibiose) ou repelentes/deterrentes (antixenose) (Kessler; Baldwin, 2002).

Através da análise metabólica por LC / MS foi possível observarmos alterações no perfil metabólico nos genótipos *B. brizantha*, *B. decumbens*, capim-elefante cv. Pioneiro e capimelefante cv. Roxo-de-Botucatu, mostrando assim que há um comportamento tanto ao nível de espécie quanto ao nível de resposta a presença do inseto sugador.

O efeito tóxico de algumas enzimas envolvidas na via biossintética sanguinarine/macarpine foi comprovado usando culturas de células de plantas elicitadas (Guízar-González et al., 2012). Essa toxicidade sugere que esses compostos possam estar envolvidos na defesa das plantas contra os herbívoros. Relatamos a presenças da via biossintética sanguinarine/macarpine no capim-elefante cv. Pioneiro (Tabela 1) e na *B. decumbens* (Tabela 3). Esse resultado pode estar envolvido como a maior resistência do capim-elefante cv. Pioneiro.

Um importante grupo de hormônios esteróides de plantas envolvidos em resposta ao estresse são os brassinosteróides (BRs). Eles são capazes de regular a biossíntese de glucosinolato (GS) (Lee et al., 2018). Observamos a presença de compostos desregulados para essa via nas quatro variedade estudadas, contudo em uma quantidade mais expressiva na *B. decumbens* (Tabela 3). Acredita-se que o papel principal dos glucosinolatos nas plantas seja respostas a estímulos externos ou ambientais. Os glucosinolatos também estão envolvidos na defesa de plantas contra insetos (Borges et al., 2017) produzindo compostos tóxicos para o inseto.

Os compostos fenólicos, como os fenilpropanoides e os flavonoides, são metabólitos secundários amplamente produzidos pelas plantas, sendo conhecidos por apresentarem atividade antioxidante e proteger as plantas dos estresses bióticos e abióticos. (Shodehinde et al., 2016; Cuong et al., 2018). Há relatos do efeito citotóxico dos flavonóides frente a resistência a pragas (Falcone Ferreyra et al., 2012). Observamos vias de metabólitos alteradas com esses compostos em capim-elefante cv. Pioneiro (Tabela 1) e em *B. brizantha* (Tabela 4) respectivamente. Esse resultado pode estar relacionado com a maior resistência do Capim-elefante cv. Pioneiro e da *B. brizantha* à *M. spectabilis*.

As características expressas por plantas resistentes pode fornecer mudanças no comportamento, fisiologia ou biologia de insetos, ou também podem apresentar apenas uma maior capacidade de suportar seu ataque. Nosso trabalho foi de natureza investigativa, apontando indícios para uma alteração no perfil de metabólitos secundários em plantas mais susceptíveis e resistentes ao ataque da *M. spectabilis*. Essas alterações podem estar relacionadas com a indução de vias de defesa ou não, capazes de justificar a sua capacidade de resistência a insetos.

5. CONCLUSÃO

Os perfis metabólicos por LC/MS confirmaram a presença de compostos presentes nas folhas das forrageiras que justificam a diferença de resistência a infestação pelas cigarrinhas. Análises integrativas indicaram que as vias metabólicas podem estar sendo alteradas em função da presença ou ausência a herbivoria. Essas informações auxiliam a elucidar mecanismos que podem ser controlados com a finalidade de se obter plantas mais resistentes a pragas, diminuindo assim o impacto de causado pela infestação. Estudos futuros são necessários para o entendimento mais amplo e claro do funcionamento desses processos.

6. AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta Praga (INCT-IPP), Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol, UFV), Embrapa Gado de Leite, Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, Y. J., KWON, M., PARK, H. M., & HAN, C. G. **Potent insecticidal activity of Ginkgo biloba derived trilactone terpenes against *Nilaparvata lugens***. Phitochemical for pest control. *ACS Symposium Series*. 658: 90–105. doi:10.1021/bk-1997-0658.ch007, 1997.

AOYAMA, E. M.; LABINAS, A. M. **Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer 8:366-386, 2012.

ALIFERIS, K.A., FAUBERT, D., JABAJI, S. A. **Metabolic Profiling Strategy for the Dissection of Plant Defense against Fungal Pathogens**. PLoS ONE. 9(11), e111930. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111930>, 2014.

ARIMURA, G.I.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. **Chemical and Molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions**. *Plant. Cell. Physiol.* 50, 911-923, 2009.

AUAD, A.M., CARVALHO, C.A., CLEMENTE, M.A., PREZOTO, F. **Diversity of social wasps (Hymenoptera) in a silvipastoral system**. *Sociobiology* v 55, p. 627–636, 2010.

BORGES, C. V., MINATEL, I. O., GOMEZ-GOMEZ, H. A., & LIMA, G. P. P. **Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites**. In M. Ghorbanpour & A. Varma (Eds.), *Medicinal Plants and Environmental Challenges* (pp. 259-277). Cham: Springer International Publishing, 2017.

CANUTO, G., COSTA, J. L., CRUZ, P., SOUZA, A., FACCIO, A., KLASSEN, A., TAVARES, M. **Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas**. *Química Nova*. doi:10.21577/0100-4042.20170134, 2017.

COSTA, N. L., MAGALHÃES, J. A., PEREIRA, R. G. A., TOWNSEND, C. R. & OLIVEIRA, J. R. C. **Considerações sobre o manejo de pastagens na Amazônia Ocidental**. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*. 40(1):37-56, 2007.

CORRALES, A.R.; CARRILLO, L.; LASIERRA,P.; NEBAUER,S.G.; DOMINGUEZ FIGUEROA, J.; RENAU-MORATA, B.; POLLMANN, S.; GRANELL, A.; MOLINA, R. V.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; MEDINA, J. **Multifaceted role of cycling DOF factor 3 (CDF3) in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in Arabidopsis**. *Plant Cell and Environment*, v. 40, n. 5, p. 748–764, 2017.

CORREA, L.A.; SANTOS, P.M. **Manejo de utilização de plantas forrageiras dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Cynodon***. São Carlos: Embrapa36 p , 2003.

CUONG, D. M. et al. **Identification and Characterization of Phenylpropanoid Biosynthetic Genes and Their Accumulation in Bitter Melon (*Momordica charantia*)**. *Molecules*, v. 23, n. 2, 2018.

DAS, A., RUSHTON, P. J., & ROHILA, J. S. **Metabolomic Profiling of Soybeans (*Glycine max* L.) Reveals the Importance of Sugar and Nitrogen Metabolism under Drought and Heat Stress.** *Plants*. 6: 21. <http://doi.org/10.3390/plants6020021>, 2017.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. **Plant Defense against Insect Herbivores.** *Int. J. Mol. Sci.* 14:10242-10297, 2013.

HOWE, G.A.; JANDER, G. **Plant immunity to insect herbivores.** *Annu. Rev. Plant. Biol.*; 59: 41-66, 2008.

GÓMEZ, J.D.A, **Proteômica e metabôlômica da soja: mecanismos moleculares da resistência à *Anticarsia gemmatilis*.** Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p.198. 2018.

GUÍZAR-GONZÁLEZ, CECILIA et al., **Sanguinarine and Dihydrosanguinarine Accumulation in *Argemone mexicana* (L) Cell Suspension Cultures Exposed to Yeast Extract.** *Journal of the Mexican Chemical Society*. 56. 19-22. 10.29356/jmcs.v56i1.270,2012.

KANT, M.R., JONCKHEERE, W., KNEGT, B. et al. **Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities.** *Ann. Bot.* 115:1015–1051, 2015.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. **Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis.** *Annual review of plant biology*, v. 53, n. 1, p. 299-328, 2002.

KOMATSU, S., NAKAMURA, T., SUGIMOTO, Y., SAKAMOTO, K. **Proteomic and metabolomic analyses of soybean root tips under flooding stress.** *Protein. Pept. Lett.* 21: 865-84, 2014.

LEE, J.J.; WEDOW, R.; OKBAY, A.; KONG, E.; MAGHZIAN, O.; ZACHER, M.; NGUYENVIET, T.A.; BOWERS, P.; SIDORENKO, J.; KARLSSON LINNÉR, R.; et al. **Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals.** *Nat. Genet.* 50, 1112–1121,2018.

LOPES, E.B.; ALBUQUERQUE, I.C.; BRITO, C.H, et al. **Velocidade de Infestação de *Dactylopius opuntia* Cockerell,1896 em Palma Gigante na Paraíba.** *Engenharia Ambiental* 6:196-205,2009.

MACEL, M., VISSCHERS, I. G. S., PETERS, J. L., KAPPERS, I. F., DE VOS, R. C. H., & VAN DAM, N. M. **Metabolomics of Thrips Resistance in Pepper (*Capsicum* spp.) Reveals Monomer and Dimer Acyclic Diterpene Glycosides as Potential Chemical Defenses.** *Journal of Chemical Ecology*, 45(5-6), 490–501. doi:10.1007/s10886-019-01074-4,2019.

MUEMA, J. M., NJERU, S. N., COLOMBIER, C., & MARUBU, R. M. **Methanolic extract of *Agerantum conyzoides* exhibited toxicity and growth disruption activities against *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Anopheles arabiensis* larvae.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16: 475. <http://doi.org/10.1186/s12906-016-1464-7> , 2016.

NALAM, V. J.; NACHAPPA, P. **The role of roots in plant defense responses to aboveground herbivores.** In: ROOT Engineering. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 369384. 2014.

ORTH, R.; FONTANELI, R.S.; FONTANELI, R.S.; SACCARDO, E. **Produção de forragem de gramíneas anuais semeadas no verão.** Ciência Rural, v.42, n.9, p.1535-1540, 2012.

OH, S.E, YEUNG, C, BABAEIRAD, R, ZHAO, R. **Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in Arabidopsis.** BMC Res Notes.7:643, 2014.

OLIVEIRA, C. M.; MAUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. **Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture.** Crop Protection, v.56, p.5054, 2014.

PANIS, D.N.; PADRÓ, J.; FURIÓ-TARÍ, P.; TARAZONA, S.; MILLA CARMONA, P.S.; SOTO, I.M.; DOPAZO, H.; CONESA, A.; HASSON, E., **Transcriptome modulation during host shift is driven by secondary metabolites in desert Drosophila.** Mol Ecol. 25(18):4534-50, 2016.

PRITCHARD, J.; GRIFFITHS, B.; HUNT, E.J. **Can the plant-mediated impacts on aphids of elevated CO₂ and drought be predicted.** Glob Chang Biol. 13:1616–1629, 2007.

SHODEHINDE, S. A. et al. **Phenolic Composition and Evaluation of Methanol and Aqueous Extracts of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L) Leaves on AngiotensinIConverting Enzyme and Some Pro-oxidant-Induced Lipid Peroxidation in vitro.** J. Evid. Based. Complement. Altern. Med. 21(4):1-10, 2016.

THANIGAIVEL, A., SENTHIL-NATHAN, S., VASANTHA-SRINIVASAN, P., EDWIN, E. S., PONSANKAR, A., SELIN-RANI, S., PRADEEPA, V., CHELLAPPANDIAN, M., KALAIVANI, K., ABDEL-MEGEED, A., NARAYANAN, R., & MURUGAN, K. **Chemicals isolated from *Justicia adhatoda* Linn reduce fitness of the mosquito, *Aedes aegypti* L.** Archives of insect biochemistry and physiology. (2017). 94. doi: 10.1002/arch.21384. Epub, 2017.

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

VIANT, M. R.; KURLAND, I. J.; JONES, M. R.; DUNN, W. D.; **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 36, 64, 2017.

SEO, H.S, SONG, J.T, CHEONG, J.J, LEE, Y.H, LEE, Y.W, HWANG, I., et al. **Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses.** Proc Natl Acad Sci USA; 98:4788–93, 2001.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. **Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja.** 804 Embrapa. Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014.. Disponível em: < 805 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102097/1/cap.-8.pdf>>, 2014.

SMITH, C.M., **Plant resistente to artropods-molecular and conventional approaches.** Springer, Berlin, Germany, 413p, 2005.

SMITH, C.M., CLEMENT, S.L. **Molecular Bases of Plant Resistance to Arthropods.** Annu. Rev. Entomol. 57: 309–28, 2012.

VALERIO, J.R.; OLIVEIRA, M.C.M., **Parasitismo de ovos de cigarrinha-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) pelo microhimenóptero Anagrus urich Pickles (Hymenoptera: Mymaridae) na região de Campo Grande, MS.** Neotropical Entomology, Londrina, v. 34, n.1, p.137-138, 2005.

WANG, X.; CHEN, H.; SHAN, Z.; HAO, Q.; ZHANG, C.; YANG, Z.; JIAO, Y. **Herbivore defense 831 responses and associated herbivore defense mechanism as revealed by comparing a resistant wild so 832 soybean with a susceptible cultivar.** The Crop Journal, v. 3, p.451–467, 833 <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.07.001>, 2015.

WAR, AR., PAULRAJ, M.G., AHMAD, T., BUHROO, A.A., HUSSAIN, B., IGNACIMUTHU, S., SHARMA, H.C. **Mechanisms of plant defense against insect herbivores.** Plant. Signal. Behav. 7: 1306-20. doi: 10.4161/psb.21663, 2012.

WILL, T.; FURCH, A.C.U.; ZIMMERMANN, M.R. **How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses.** Frontiers in Plant Science. 4: 1–12, 2013.

ZHANG, J., YANG, D., LI, M., SHI, L. **Metabolic Profiles Reveal Changes in Wild and Cultivated Soybean Seedling Leaves under Salt Stress.** PLoS ONE. 11: e0159622. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0159622>, 2016.