

ANGELO JOSÉ RINALDI

**ANÁLISE DE COMPONENTES MOLECULARES DA ESPUMA E DA TOXINA
PRESENTE NA GLÂNDULA SALIVAR DE CIGARRINHA DAS PASTAGENS**

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

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira

Coorientadores: Humberto Josué de O. Ramos
Yaremis Beatriz Meriño Cabrera

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R578a Rinaldi, Angelo José, 1978-
2021 Análise de componentes moleculares da espuma e da toxina
presente na glândula salivar de cigarrinha das pastagens / Angelo
José Rinaldi. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (51 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2021.

Referências bibliográficas: f. 46-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.149>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Citocalasinas. 2. Cigarrinha-das-pastagens. 3. Glândulas
salivares. I. Oliveira, Maria Goreti de Almeida. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 615.95292

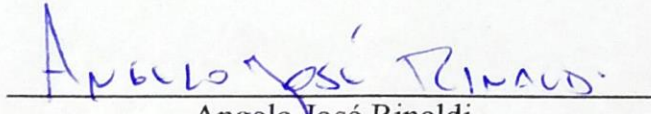
ANGELO JOSÉ RINALDI

**ANÁLISE DE COMPONENTES MOLECULARES DA ESPUMA E DA TOXINA
PRESENTE NA GLÂNDULA SALIVAR DE CIGARRINHA DAS PASTAGENS**

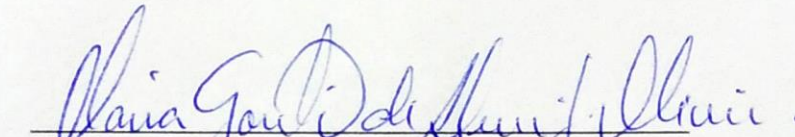
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2021.

Assentimento:



Angelo José Rinaldi
Autor



Maria Goreti de Almeida Oliveira
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tem me guiado e protegido nessa caminhada e em toda a minha vida.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de realização do curso, professores, funcionários e amigos pelo aprendizado e pelo conhecimento adquirido.

A Embrapa Gado de Leite por disponibilizar material biológico para condução da pesquisa.

A toda equipe do Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL), pela ajuda nas análises das amostras.

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

Aos colegas do laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos pela oportunidade de troca de conhecimento e aprendizado. Em especial: Ao Lucas Leal, Angélica Gouveia, Luana Monteiro e Rafael Barros, sem eles, seriam inviável a execução deste projeto.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas BIOAGRO/INCT-IPP por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, principalmente a minha esposa pelo carinho, apoio e confiança na realização deste projeto.

Aos meus pais e meus irmãos, em particular, o Fernando que tem segurado a onda nessa minha empreitada.

A professora Maria Goreti de Almeida Oliveira pela orientação, apoio e confiança no meu trabalho.

Ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos, pelos ensinamentos, exemplo, competência e dedicação a ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

RINALDI, Angelo José, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Análise de componentes moleculares da espuma e da toxina presente na glândula salivar de cigarrinha das pastagens.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos e Yaremis Beatriz Meriño Cabrera.

Mahanarva spectabilis conhecida como cigarrinha-das-pastagens é o principal inseto-praga que causa severos danos as forrageiras tropicais, comprometendo a produção bovina e também a cadeia leiteira. Os adultos das cigarrinhas atacam a planta causando danos foliares como a clorose. As ninfas, por sua vez, criaram um mecanismo de proteção eficaz contra perda de umidade, contra variações de temperaturas e contra ação de inimigos naturais que é a produção de uma espuma que o encobre. Como estes mecanismos podem ser importantes para o controle do inseto-praga, foram analisados alguns dos constituintes das glândulas salivares como agentes citotóxicos, além da constituição proteica da espuma. Análises por SDS-PAGE LC/MS identificaram a região codificadora de uma proteína de 66 kDa apresentando alta abundância relativa na espuma. A presença deste gene de origem genômica foi confirmada por PCR, e como sendo de função desconhecida pela ausência de homólogos descritos. Um metabólito presente em alta abundância na glândula salivar foi identificado com alta similaridade com a toxina de origem fúngica Citocalasina B, podendo estar envolvido na produção do sintoma de clorose nas folhas. Portanto, as caracterizações funcionais dos componentes moleculares identificados poderão ser alvo para o desenvolvimento de mecanismo de controle na interação do inseto-praga.

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

ABSTRACT

RINALDI, Angelo José, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Analysis of molecular components of foam and toxin present in the salivary gland of pasture spittlebugs.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos and Yaremis Beatriz Meriño Cabrera.

Mahanarva spectabilis known as spittlebugs is the main insect pest that causes severe damage to tropical forages, compromising cattle production and also the dairy chain. The adults of spittlebugs attack the plant causing leaf damage such as chlorosis. The nymphs, in turn, created an effective protection mechanism against moisture loss, against temperature variations and against the action of natural enemies, which is the production of a foam that covers it. As these mechanisms can be important for the control of the insect pest, some of the constituents of the salivary glands were analyzed as cytotoxic agents, in addition to the protein composition of the foam. Analysis by SDS-PAGE LC/MS identified the coding region of a 66 kDa protein with high relative abundance in the foam. The presence of this gene of genomic origin was confirmed by PCR, and as being of unknown function due to the absence of described homologues. A metabolite present in high abundance in the salivary gland was identified with high similarity to the fungal toxin Cytochalasin B, which may be involved in the production of the symptom of chlorosis in the leaves. Therefore, the functional characterizations of the identified molecular components could be a target for the development of a control mechanism in the insect pest interaction.

Keywords: Spittlebug. Salivary gland. Proteomics. Plant-pest interaction. Foam. Cytochalasin B.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	08
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Forrageiras para pastagens de gado.....	10
2.2. Pecuária no Brasil e o problema das pastagens.....	10
2.3. O inseto.....	12
2.4. Aparelho Bucal.....	13
2.5. Fitotoxemia.....	14
2.6. Intestino.....	15
2.6.1. Túbulo de Malpighi.....	16
2.7. Espuma, o microambiente particular.....	17
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Insetos.....	22
4.2. Coleta da Espuma, da glândula de Batelli e da glândula salivar.....	22
4.3. Determinação da concentração de Proteína Total.....	22
4.4. Eletroforese SDS-PAGE.....	23
4.5. Digestão trípica.....	23
4.6. Identificação de proteínas da espuma por espectrometria de massas (LC/MS).....	24
4.7. Análise de metabólitos da glândula salivar de <i>Mahanarva spectabilis</i> por LC/MS.....	24
4.8. Extração do DNA dos insetos.....	26
4.9. Amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	26
4.10. Bioensaio de Avaliação de Citotoxicidade das Folhas de Capim Elefante.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Análise de concentração de proteínas na espuma.....	28
5.2. Perfil de proteínas da espuma por SDS-PAGE LC/MS.....	28

5.3. Análise das sequências identificadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -MS.....	31
5.4. Estimativa da massa molecular para o contig traduzido.....	31
5.5. Análise por PCR do contig identificado.....	34
5.6. Análise de metabólitos da glândula salivar de <i>Mahanarva Spectabilis</i> por LC/MS.....	37
5.7. Avaliação da Citotoxicidade nas Folhas de Capim Elefante.....	43
6. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICE: Resultado da busca do BLAST-MS:.....	50

1- INTRODUÇÃO.

Cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) são importantes pragas de gramíneas forrageiras na região neotropical (VALÉRIO; NAKANO, 1977; VALÉRIO, 2009). São insetos que sugam a seiva das plantas e regurgitam nas folhas a saliva contendo enzimas tóxicas (NUNES; CAMARGO-MATHIAS, 2006). Como consequência, os canais condutores são bloqueados resultando em folhas amareladas, conferindo um aspecto queimado à planta. Os danos causados pelas cigarrinhas-das-pastagens são consequências da sucção da seiva, preferencialmente do xilema, assim como da injeção de secreções salivares no tecido vegetal, interferindo até na atividade fotossintética da planta (VALÉRIO, 2009, 2013).

Dentre as cigarrinhas, *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) é de particular interesse por sua alta adaptabilidade e alimentação voraz de gramíneas forrageiras comumente cultivadas para a pecuária, como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). Ovos de *Mahanarva* spp. são colocados durante os surtos intensos que ocorrem nas estações chuvosas e estes, apresentam diapausa, o que mantém a viabilidade dos ovos durante as estações secas (VALÉRIO, 2009). Ninfas da cigarrinha das pastagens, *M. spectabilis*, desenvolvem-se nas raízes adventícias inferiores de algumas gramíneas. Essas ninfas são encontradas nas plantas envoltas por uma espessa espuma branca, produzida pelas glândulas de Batelli. Embora não apresente efeito direto no hospedeiro, a espuma auxilia na proteção contra inimigos naturais e fatores externos em geral, como termorregulação (GREGG HENDERSON; HOFFMAN; JEANNE, 1990; TONELLI et al., 2018). A caracterização molecular dessa espuma ainda não foi elucidada, mas Tonelli et al. (2018) mostraram que carboidratos, ácidos graxos e proteínas estão presentes, mas não foram identificadas. Perfis de SDS-PAGE unidimensionais de espuma de ninfas de *M. spectabilis* variam de acordo com o genótipo de gramínea forrageira com que são alimentadas (AUAD et al., 2012).

Outro fator importante para *M. spectabilis* é a glândula salivar, que auxilia na digestão extra-oral e na penetração do estilete bucal (NUNES; CAMARGO-MATHIAS, 2006). A regurgitação da saliva por *M. spectabilis* na seiva é conhecida por produzir efeitos tóxicos às plantas, possivelmente devido à presença de moléculas efetoras que auxiliam o inseto no sucesso da infestação pelo hospedeiro que prejudicam a síntese de clorofila, causando amarelecimento das folhas e perda de palatabilidade (ZHU; YAO; LUTTRELL, 2016). Por exemplo, Saraiva et al. (2021) mostraram a presença de enzimas apirase e outros metabólitos, como o ácido salicílico, na glândula salivar de adultos de *M. spectabilis*, quando alimentadas

com capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). A presença de metabólitos e hormônios pode auxiliar na infestação, afetando o equilíbrio de vias de sinalização que desencadeiam respostas defensivas em gramíneas forrageiras.

Monteiro et al. (2021) detectou vários fitohormônios presentes na glândula salivar como etileno, ácido jasmônico, metil jasmonato, ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina e ácido salicílico, presentes na glândula salivar, envolvidos na modulação de respostas de defesas de plantas hospedeiras. Monteiro et al. (2021) também identificou 36 proteínas na glândula salivar de *M. Spectabilis* presentes durante a alimentação de diferentes gramíneas forrageiras relacionadas a diversos processos biológicos como ribossomos, proteínas de exportação, fagossomas e proteínas de processos endoplasmáticos envolvidos com a síntese de proteínas; dentre outros processos regulatórios.

Devido à importância da espuma para as ninfas, a caracterização molecular da produção e constituição podem destacar novos alvos moleculares, portanto, novas abordagens de manejo de pragas. Além disso, hipotetizamos que, os metabólitos presentes em sua glândula salivar, podem estar relacionados com a capacidade desse inseto praga causar toxicidade às folhas e infestar com sucesso o capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Sendo assim, objetivou-se identificar as proteínas presentes na espuma das ninfas de *M. spectabilis* e confirmar a presença do gene e analisar os metabólitos presentes na glândula salivar desse inseto praga.

2- REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. Forrageiras para pastagens de gado.

A área de pastagens tem aumentado e isso deve-se à adoção de novas tecnologias pelos pecuaristas, como vacinação, mineralização, técnicas de manejo das pastagens e, especialmente, ao uso de novas forrageiras mais adaptadas e produtivas, resultantes de intensas atividades das instituições de pesquisa (ZAGO et al., 2010).

As principais forrageiras usadas como pastagens e mais cultivadas no Brasil são: *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e o *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) (DA FONSECA et al., 1998). O interesse financeiro dessas espécies de forrageiras tornam fundamental a pesquisa de pragas que possam a acometer (FERRAZ; FELÍCIO, 2010). Os pastos brasileiros, igualmente, constituem uma alternativa barata e abundante para a produção bovina (HOFFMANN et al., 2014).

A *Brachiaria brizantha* apresenta como uma de suas principais características a resistência contra cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae). Por outro lado, a *Brachiaria decumbens* tem-se apresentado como a espécie mais vulnerável às diversas espécies de cigarrinhas (SILVA et al., 2017). O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), no que lhe concerne, apresenta características favoráveis para a produção, em uma boa adaptação ao clima e solo, e alta produção de matéria seca e também tem uma boa adaptação às condições de clima e solo do Brasil (SHIMOYA et al., 2002).

2.2. Pecuária no Brasil e o problema das pastagens.

O Brasil possui o maior rebanho comercial de gado de corte e é um dos principais exportadores de carne bovina do mundo (USDA, 2016). A carne bovina brasileira representa 20% de todo o comércio mundial de carne bovina e, juntamente com outras commodities agrícolas, soma cerca de 21% do produto interno bruto no Brasil (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA-ESALQ/USP, 2021). A produção de carne bovina no Brasil é caracterizada por sistemas baseados em pastagens, dos quais quase 90% do gado abatido é proveniente (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE, 2020). A produção de leite de vaca, assim como o gado de corte tem também sua importância econômica. Por exemplo, em 2019, teve um aumento no

consumo chegando a 34,8 bilhões de litros, um aumento significativo de 2,7% em relação ao ano de 2018 e o valor da produção subiu para 43,1 bilhões. A região Sudeste com um aumento em 4,4 % voltou a ser a maior produtora de leite do país em 2019, com 34,3% de participação do montante. Sendo que, Minas Gerais como o maior estado produtor, seguido por Paraná e Rio Grande do Sul. Os três juntos colaboram com um pouco mais da metade da produção do leite nacional com cerca de 51,9%. (IBGE, 2017).

Os 215 milhões de cabeças de gado no Brasil ocupam aproximadamente 170 milhões de hectares e destes, 70 % das espécies de pastagens são cultivadas e representadas pelo capim marandu (*Brachiara brizantha*) (IBGE, 2017; SPAROVEK et al., 2012).

As áreas pastagens carregam a oportunidade para atender demandas atuais importantes ao setor agropecuário, como as soluções de problemas ambientais atuais, o aumento da produção pecuária para atender a demanda por consumo e promover o desenvolvimento econômico do país. Levando em conta que a pastagem é o alimento principal - muitas vezes exclusivo - para o rebanho bovino brasileiro, a produtividade pecuária está diretamente relacionada à qualidade e produtividade das forrageiras. Em média, a produtividade da pecuária no Brasil é baixa - com lotação bovina inferior a uma unidade animal por hectare (450 kg/ha) - o que leva a concluir que, em média, a qualidade e produtividade das forrageiras também é baixa (PARENTE et al., 2019).

E esperasse uma produção de carne bovina superior a 1500 kg de peso corporal hectare por ano, mas, a média brasileira é muito menor, com cerca de 150 kg de peso corporal hectare por ano (PENATI et al., 2014).

A justificativa para essa baixa produtividade e qualidade baseia-se em três fatores: estratégias inadequadas de manejo, baixa fertilidade do solo e danos causados por pragas (CONGIO, 2010). Dentre as pragas comumente referidas, recebe grande destaque a cigarrinhas-das-pastagens. Auad, et al. (2010), relatam que as cigarrinhas-das-pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant,1909) (Hemiptera: Cercopidae) acometem os principais gêneros de forragens e sua infestação está entre os principais estresses bióticos enfrentados por gramíneas forrageiras no Brasil, reduzindo a produtividade das pastagens e causando grandes impactos econômicos.

2.3. O inseto.

A *Mahanarva spectabilis* faz parte de uma classe variada de insetos sugadores de gramíneas chamadas cigarrinhas-das-pastagens (AUAD; CARVALHO, 2009). Estes insetos pertencem à ordem Hemiptera, subordem Auchenorrhyncha e superfamília Cercopidea (RESH; CARDE, 2009).

Além da *Mahanarva spectabilis* temos também outras espécies danificadoras das pastagens dos gados, como a espécie *Deois incompleta* (Walker), que tem sido a mais importante na região Norte; *Notozulia entreriana* (Berg), *Deois schach* (Fabricius) e *Aeneolamia selecta* (Walker), encontradas na região Nordeste; e a espécie *Deois flavopicta* (Stal) que, com *N. entreriana*, predomina nos Estados do Brasil Central, norte do Paraná e na região Leste (VALÉRIO, 2009).

O ciclo biológico da cigarrinha-das-pastagens compreendem 3 estágios de desenvolvimento: ovo-ninfa-adulto, denominada de hemimetabolia (metamorfose parcial ou incompleta, aquela que a ninfa se assemelha ao adulto diferindo deste, no tamanho e na ausência de asas) (VALÉRIO, 2009).

O ovo tem características alongada, coloração amarelo pálida e com o decorrer do desenvolvimento embrionário, observa-se um aumento no tamanho e surgimento de manchas avermelhadas e de um opérculo enegrecido, por onde eclode a ninfa (VALÉRIO, 2009). Estes ovos estão presentes ao nível do solo ou sobre restos vegetais próximos a base das plantas hospedeiras (VALÉRIO, 2009). Neste período de formação do ovo pode ocorrer por volta de 15 dias, favorecidos por clima quente e úmido, porém, nos ovos em diapausa (ovos em quiescência) essa duração pode se estender ainda mais por aproximadamente 200 dias, relacionados com meses de baixa pluviosidade e temperaturas (AUAD; CARVALHO, 2009; KOŠTÁL et al., 2017).

Na fase de ninfa temos uma semelhança com o adulto, diferindo em seu tamanho e ausência de asas, a metamorfose é apenas parcial ou incompleta (VALÉRIO, 2009). Nesta fase de desenvolvimento, o inseto passa a sugar continuamente a seiva bruta do xilema das raízes, característica de insetos sugadores cercopídeos, ocasionando desordem fisiológica em decorrência das picadas que danificam os vasos lenhosos da raiz deteriorando, dificultando e impedindo o fluxo de água e nutrientes (AUAD et al., 2010). Outra característica, que se diferencia dos adultos, que as ninfas evolutivamente criaram um mecanismo de proteção contra

perda de umidade, contra variações de temperaturas e contra ação de inimigos naturais: é a produção de uma massa de espuma que envolve o inseto (substância essa que será detalhada em seção posterior) (BYERS; WELLS, 1966). E essa produção de espuma está diretamente relacionada com a grande quantidade de líquido excretada pelas cigarrinhas que são sugados continuamente das seivas brutas do xilema (BYERS; WELLS, 1966). A medida que o líquido é excretado, estruturas como glândulas de Batelli e túbulos de Malpighi secretam substâncias, além também de contrações do abdômem do inseto adicionando bolhas de ar ajudando na estabilização da espuma (MARSHALL, 1965). A produção de espuma só vem a ser interrompida antes da última troca de pele, ecdise, situação em que a ninfa transforma-se no adulto com asas (VALÉRIO, 2009).

A ocorrência de cigarrinhas está restrita à épocas chuvosas do ano. No período seco, elas permanecem no solo da pastagem na fase de ovo de forma diapáusicas (resistente às condições adversas do meio ambiente e em especial a baixos níveis de umidade) por um período aproximado de 180 a 200 dias. A eclosão dos ovos só ocorrerá quando das primeiras chuvas, geralmente nos meses de setembro e outubro região Central do Brasil num período aproximado de 25 a 30 dias. Lógico que, o ciclo varia com as diferentes espécies, mas, basicamente está ao redor de 50 dias (VALÉRIO, 2009).

2.4. Aparelho Bucal.

Os aparelhos bucais dos insetos que se alimentam de fluídos são modificados para formar um canal ao qual o líquido pode ser puxado para boca e outro através do qual a saliva passa, tipo sugador (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). Em Hemiptera, que se alimentam de fluidos dentro de plantas ou animais, alguns componentes do aparelho bucal são modificados para perfurar, e as estruturas alongadas são chamadas de estiletes (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013).

Anatomicamente no aparelho bucal destes insetos temos: as mandíbulas, maxilas, canal salivar, canal alimentar e labium.

O funcionamento do aparelho bucal das cigarrinhas consiste do par externo de mandíbulas modificadas que, com suas pontas serrilhadas, perfura o tecido vegetal, fazendo facilmente a penetração, e do par interno de maxilas modificadas (VALÉRIO, 2009). Os estiletes que compõem o par interno acoplam-se, um ao outro, de tal forma a originarem dois

canais: um para a sucção da seiva e, o outro, para a introdução de secreções salivares (VALÉRIO, 2009). Após selecionar um local de alimentação com bases em pistas visuais e químicas e inserir os estiletes, o inseto imediatamente faz uma sondagem no tecido da planta e passa a secretar saliva da bainha que endurece em contato com o ar ou com fluido para formar uma bainha salivar impermeável em torno dos estiletes. A bainha forma uma vedação hermética que evita o vazamento de ar ou fluido durante a alimentação. A sondagem do estilete continua até que um tecido adequado seja encontrado (xilema, floema ou mesofilo, dependendo da espécie), após o que a alimentação pode começar. Durante a alimentação, saliva aquosa é injetada na planta para ajudar na digestão e para evitar o entupimento da abertura do estilete. Este também é o mecanismo pelo qual o inseto pode infectar a planta com patógenos. A alimentação pode durar de alguns segundos a muitas horas de cada vez, dependendo da espécie de Auchenorrhyncha e da qualidade do tecido da planta. A seiva da planta é uma fonte de alimento nutricionalmente desequilibrada; o floema é rico em açúcar e o xilema é, em geral, pobre em nutrientes e extremamente diluído. Uma ampla gama de endossimbiontes procarióticos transmitidos transovariamente (isto é, da mãe através de seus ovos para sua prole) também foram identificados em várias espécies de Auchenorrhyncha. Os papéis desses endossimbiontes não foram totalmente elucidados, mas presumivelmente eles funcionam na conversão da seiva nutricionalmente pobre da qual os insetos se alimentam em vitaminas essenciais, aminoácidos e esteróis. Os simbiontes são alojados intracelularmente em células especializadas do corpo adiposo chamadas micetócitos, intracelularmente no corpo adiposo ou no intestino epitélio (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013).

2.5. Fitotoxemia.

De acordo com Chapman; Simpson e Douglas (2013), fitotoxemia seriam distúrbios bioquímicos e fisiológicos na planta em resposta ao dano mecânico e/ou introdução de fitotoxinas causados pela alimentação do inseto. As fitotoxinas geralmente são produzidas por artrópodes que sugam fluidos das plantas e envolve principalmente os insetos Hemipteros. Os compostos químicos envolvidos na fitotoxemia são pouco compreendidos, mas inclui algumas enzimas adaptadas à dieta do inseto que tem efeitos adversos na planta hospedeira. Pectinases, proteases, amilases, sacarases, lipases e fenolases estão entre os compostos identificados que danificam as plantas (fitotoxemia).

Os danos causados pelas cigarrinhas-das-pastagens, portanto, são consequências da sucção da seiva, preferencialmente do xilema, assim como da injeção de secreções salivares no tecido vegetal interferindo até na atividade fotossintética da planta (VALÉRIO, 2009). Tanto as ninfas quanto os adultos causam danos, este último mais vorazmente, causando mais prejuízos, o que se observa como reação na planta a princípio como listras ou faixas cloróticas evoluindo para um quadro severo de dano foliar (BYERS; WELLS, 1966; VALÉRIO, 2009). Devido a isso, toda a área da pastagem poderá se apresentar amarelada e seca reduzindo drasticamente o crescimento da gramínea afetando a sua produção e qualidade (VALÉRIO, 2009).

2.6. Intestino.

O sistema digestivo do inseto é dividido em três principais regiões: O intestino anterior, de origem ectodérmica; o intestino médio, endodérmico; e o intestino grosso ou posterior, também ectodérmico (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). Este sistema é responsável por todas as etapas fisiológicas do processamento dos alimentos: digestão, absorção, liberação e eliminação das fezes (RESH; CARDE, 2009). O intestino anterior e posterior possuem células cobertas por uma cutícula e o intestino médio tem células separadas do alimento por uma camada semelhante a uma estrutura anatômica denominada membrana periotrófica (RESH; CARDE, 2009).

A composição e a formação da membrana periotrófica variam entre insetos, geralmente compreende de um gel de proteoglicano em uma estrutura de microfibrilas de quitina que funciona como uma barreira, separando as células do intestino médio do alimento ingerido (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). Com isso, pode proteger a parede intestinal de danos causados por material ingerido, incluindo partículas alimentares abrasivas, patógenos e certas toxinas (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). A membrana periotrófica separa o lúmen intestinal em dois compartimentos: o espaço endoperiotrófico (entre o envelope periotrófico e as células do intestino médio) e o espaço ectoperiotrófico (no lúmen intestinal), permitindo a compartimentação das atividades enzimáticas e a geração de um fluxo contracorrente de fluidos que aumenta a eficiência de absorção (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013).

A proteção química é ilustrada por vários insetos fitófagos, incluindo gafanhotos *Schistocerca* e alguns lepidópteros larvais, nos quais a membrana periotrófica forma uma barreira eficaz contra os taninos, um dos principais constituintes de muitas plantas das quais esses insetos se alimentam. As moléculas de tanino são muito menores do que os poros nos envelopes dessas espécies, e como essas moléculas são retidas pela membrana não está totalmente esclarecida (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). A membrana periotrófica de alguns insetos, entretanto, não confere proteção contra os taninos. Por exemplo, a membrana de *Locusta* é permeável ao ácido tânico; quando esses insetos ingerem alimentos contendo ácido tânico, eles incorrem em lesões importantes no epitélio do intestino médio, resultando em alta mortalidade (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013).

2.6.1. Túbulo de Malpighi.

Túbulo de Malpighi é uma estrutura de tubos longos e finos, originando-se no intestino próximo à junção do intestino médio e posterior dos insetos situados livremente na cavidade corporal, que constituem um importante sistema de excreção e osmorregulação (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013; RESH; CARDE, 2009; WIGGLESWORTH, 1972). Análoga aos rins dos vertebrados, esta estrutura são os órgãos excretores primários dos insetos e baseiam sua filtração na pressão hidrostática (RESH; CARDE, 2009). A urina primária produzida nos túbulos de Malpighi contém sais e aminoácidos e passa para o intestino posterior junto com o restante dos alimentos do inseto, e são absorvidos por meio de bombas especiais, como as de cloreto e cálcio, e simporte de aminoácidos dependentes de sódio (RESH; CARDE, 2009).

Alguns insetos utilizam os túbulos de Malpighi também para outras funções, funções não excretoras: as larvas da crisopa, por exemplo, têm algumas das células tubulares grossas e produzem a seda usada para construir o casulo pupal. Os túbulos das formigas-leões larvais também produzem seda, que é armazenada em um saco retal e usada durante a pupação. Nas cigarrinhas adultas os túbulos de fato funcionam exclusivamente como órgãos excretores (MARSHALL; CHEUNG, 1974), mas já, nas cigarrinhas jovens a região proximal dos túbulos larvais são aumentadas, consistindo de grandes células sem microvilosidades e essas células produzem o material que, quando misturado ao ar, forma a espuma dentro da qual vivem as ninfas (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013; POLIGNANO, 2019; RESH; CARDE, 2009). Desta forma, os túbulos de Malpighi apresentam uma especialização diferenciada e bastante ativa apenas no estágio ninfal e durante este período, o segmento proximal do túbulo

curto e inflado produz grandes quantidades de mucopolissacarídeo nos complexos lamelares de Golgi (LI et al., 2015) e no segmento distal longo tem-se a produção de uma secreção proteica no retículo endoplasmático rugoso e um sistema de canalículos intracelulares (MARSHALL, 1973).

2.7. Espuma, o microambiente particular.

Durante os seus estágios de ninfa, inseto cercopídeos, produzem espumas que são formadas por líquidos eliminados pelo ânus e pelos espiráculos, em quantidade que depende do volume de seiva sugada, que cobrem o seu corpo completamente por aproximadamente 15-30 minutos (HAMILTON, 1982) e constituído de uma substância mucilaginosa secretada pelas glândulas epidérmicas do sétimo e oitavo segmentos abdominais, denominadas glândulas de Batelli (GUILBEAU, 1908).

Os pares de espiráculos, aberturas do sistema traqueal, localizadas ventralmente, liberam periodicamente bolhas de ar em um líquido a partir do ânus. Este líquido contém 99,30–99,75% de água e os ingredientes proteicos essenciais produtores de espuma (CHEN et al., 2018).

Essencialmente, os líquidos espumosos são agregações ou grupos de bolhas contendo proteínas e mucopolissacarídeos (MELLO et al., 1987), cujas superfícies são estabilizadas e aderem umas às outras (CHEN et al., 2018). As moléculas anfipáticas são adsorvidas pelas interfaces gás - líquido e reduzem a tensão superficial. Assim, o tamanho da bolha depende, primeiro, das concentrações de proteína e mucopolissacarídeo no líquido, porque concentrações maiores permitem que bolhas menores sejam produzidas e, em segundo lugar, do raio do orifício através do qual as bolhas da interface líquido-ar são liberadas.

Denominaremos aqui, essa espuma, de bioespuma por ser um produto proveniente de um agente biológico. Em termos de função ecológica, essa bioespuma protege as larvas contra predadores (GREGG HENDERSON; HOFFMAN; JEANNE, 1990), cria um microclima que reduz os riscos de superaquecimento e ressecamento (WHITTAKER, 1970; ZEDADRA et al., 2019), pode atuar como neutralizador de amônia tóxica (RAKITOV, 2002) e até mesmo contra crescimento de fungos (LI et al., 2015).

As ninfas produzem as bioespumas como uma adaptação termorreguladora já que são insetos ectotérmicos (temperatura interna do corpo varia de acordo com a temperatura do ar)

criando um microhabitat térmico. De acordo com estudos feitos por Tonelli et al., (2018), foi demonstrado que com dados combinados de campo e laboratório indicavam que a produção de espuma de ninfa resultava em uma temperatura interna relativamente constante em uma ampla faixa de temperaturas do ar externo que cria um microhabitat térmico adequado para a sobrevivência da ninfa (**Fig. 1**).

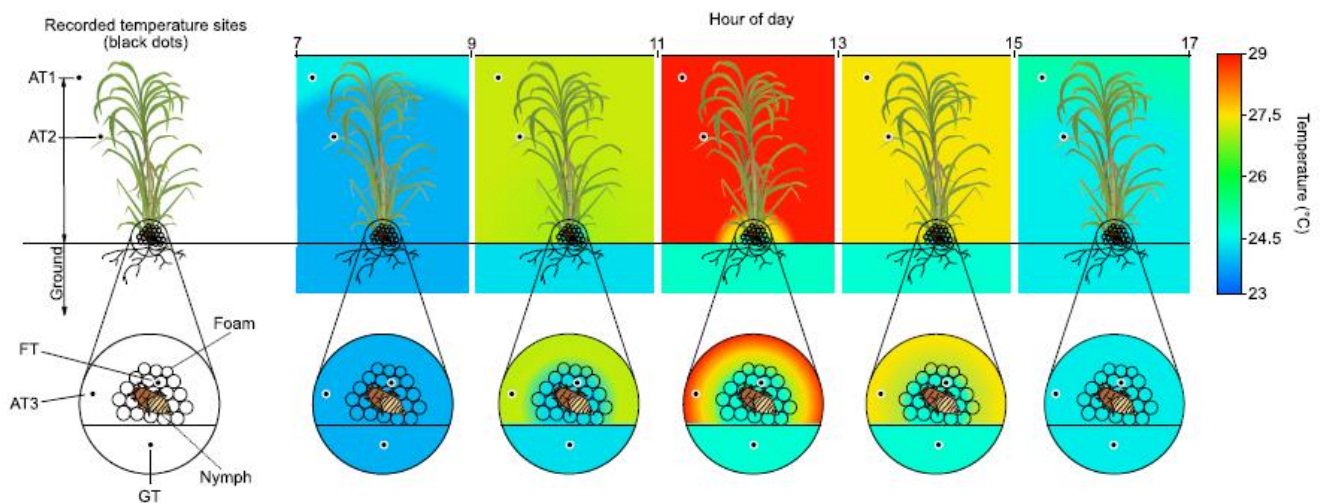


Fig. 1: Comparação da variação térmica no interior e exterior da espuma produzida por ninfas de *Mahanarva fimbriolata*. Fonte: (Tonelli et al., 2018)

Nos estudos Chen et al. (2018), foi demonstrado que a bioespuma também possui propriedades importantes que a tornam uma barreira eficaz contra a radiação solar potencialmente prejudicial. Nas medidas de refletividade de espumas coletadas de ninfas de quarto e quintos instar foi demonstrado que em uma faixa de comprimento de onda de 300 a 1100 nanômetros a maior parte da luz visível e radiação ultravioleta (UV) são refletidas pela espuma. Também, neste mesmo estudo, foi visto que a transmitância da radiação visível e UV foi sempre inferior a 15% e atingiu 12% no comprimento de onda de 350 nm devido à alta refletividade da espuma corroborando o efeito protetivo da bioespuma.

De acordo com Beckett, Robertson e Matthews (2019), as ninfas não utilizam o oxigênio (O_2) das bolhas de ar pressas dentro da bioespuma para não colapsarem. Entretanto, elas respiram O_2 atmosférico continuamente, estendendo a ponta do abdômem, principalmente a parte ventral, aonde situa-se os espiráculos para fora da bioespuma e isso permite que esses insetos absorvam continuamente O_2 e liberam CO_2 enquanto se alimentam do xilema. Se

porventura, uma ninfa fique preso em sua própria espuma, poderá usar o O₂ dentro das bolhas de ar.

Outra característica importante para a estabilização das bioespumas são as concentrações de proteínas. De acordo com Chen et al (2018), uma tensão superficial muito baixa cerca de 44 mN/m em concentração de proteínas de 178 µg/mL ajuda a superar a tensão superficial da água de forma eficaz. A formação inicial de espumas ou bolhas são facilitadas pela redução da tensão superficial, e esta é a base para formação de sabões. As medições de tensão superficial com diluições em série de fluidos de espuma mostram uma redução dramática na tensão superficial do valor de água pura cerca de 74 mN/m para abaixo de 55 mN/m em concentrações de proteína total tão baixos quanto 10 µg/mL. As ninfas de primeiro instar possuíam líquidos de espuma com a concentração mais alta, ou seja, $296,5 \pm 10$ µg/ml. As concentrações produzidas por ninfas de segundo, terceiro, quarto e quinto instar foram $245,4 \pm 10$, $189,7 \pm 10$, $148,6$ e $157,4 \pm 10$ µg/mL, respectivamente. A espuma líquida produzida pelas ninfas exibiu fortes propriedades de superfície e reduziu a tensão superficial da água a um grau muito maior do que a proteína de controle (BSA) (**Fig. 2**). Em concentrações de proteína total acima de 30 µg/ml, correspondendo a uma diluição de seis vezes do fluido de espuma, a tensão superficial cai drasticamente do valor da água pura (cerca de 73 mN/m) para cerca de 43 mN/m nas concentrações de cerca de 178 µg/ml, presente nos líquidos de espuma combinados de ninfas de todos os instares. A concentração de proteína do fluido de espuma misturado se aproximou da concentração do líquido de espuma produzida por ninfas de terceiro instar.

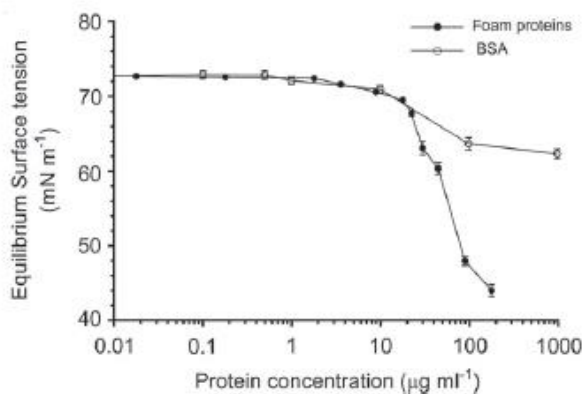


Fig. 2: Tensão superficial versus concentração de proteína no fluido de espuma em comparação com uma proteína de controle de surfactante moderada (albumina de soro bovino, BSA). Houve diferenças

significativas entre as concentrações com caracteres diferentes ($P < 0,01$, anova unilateral com diferença mínima significativa pós-teste). Fonte: (Chen et al., 2018).

3- OBJETIVOS

Caracterizar as moléculas e os componentes químicos da espuma produzida pela ninfa das cigarrinhas-das-pastagens.

Caracterizar os metabólitos presente na glândula salivar do inseto e nas folhas infestadas pelos mesmos.

3.1- Objetivos específicos:

- 1) Coletar espumas e ninfas de *M. spectabilis* infestando capim elefante.
- 2) Extrair e separar as proteínas por eletroforese em gel de SDS-PAGE.
- 3) Análise das proteínas da espuma por espectrometria de massas LC/MS.
- 4) Análise de metabólitos presentes na glândula salivar do inseto e nas folhas infestadas por LC/MS.
- 5) Extração de DNA genômico da do inseto inteiro e da glândula de Batelli da cigarrinha das pastagens.
- 6) Amplificação das sequências obtidas por PCR para confirmação da presença de genes da glândula salivar e/ou glândula de Batelli da cigarrinha.
- 7) Avaliar Citotoxicidade nas Folhas de Capim Elefante.

4- MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1. Insetos.

Aproximadamente mil ninfas de quarto e quinto instares, e adultos de *Mahanarva spectabilis*, foram coletadas no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco, Minas Gerais e levadas para o Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As ninfas foram colocadas em *Pennisetum purpureum* cv. Roxo de Botucatu obtidas das pastagens do campo experimental do departamento de zootecnia da UFV e transplantadas para vasos contendo a mistura de solo e substrato comercial na proporção de 1:1; v/v envolvidas com organza para evitar a fuga dos insetos, a 25° C e 70 % de umidade relativa até o surgimento dos adultos.

4.2. Coleta da Espuma, da glândula de Batelli e da glândula salivar.

A coleta da espuma foi realizada diretamente da produção pelas ninfas da *Mahanarva spectabilis*, que estavam alojadas em vasos de capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Foram recolhidas em tubos de centrifugação 50 mL tipo fundo cônico (tipo Falcon) e armazenada e conservada em ultrafreezer a -80° C.

A extração das glândulas de Batelli das ninfas que ficam localizada no abdômen ventral do inseto, foi realizada com auxílio de pinça, bisturi e lupa S2H10 Olympus objetiva 0,75 X. Após extração, foram armazenadas em água purificada de 10^{-3} M HCl pH 3 em microtubos de 2 mL em ultrafreezer a -80° C.

Também foram extraídos as glândulas salivares dos adultos das cigarrinhas das pastagens com bisturi e pinça com auxílio de lupa S2H10 Olympus objetiva 0,75 X e posteriormente armazenadas em água purificada 10^{-3} M HCl pH 3 e transferido em tubo tipo Falcon e armazenadas em ultrafreezer a -80° C.

4.3. Determinação da concentração de Proteína Total.

A determinação da concentração de proteínas da espuma das ninfas foi determinada utilizando albumina soro bovina (BSA) como padrão (Bradford, 1976). As análises foram realizadas no comprimento de onda de 595 nm. As concentrações das espumas produzidas pelas

ninfas foram calculadas comparando-se as medidas do espectrofotômetro com as absorbâncias da solução de BSA 0.2%, de concentração já conhecida.

4.4. Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese das proteínas extraídas da espuma, foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970). O gel de separação utilizado foi de 1,5 mm de espessura e concentração de 10% de poliacrilamida tamponada em 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. Cada canaleta recebeu 50 µg de proteínas totais, derivadas das amostras com tampão de amostra composto por 277,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 44,4% glicerol e 4,4% SDS. As proteínas separadas na eletroforese foram aquelas provenientes da espuma das ninfas das cigarrinhas. A corrida eletroforética foi executada a 200 V para, em seguida, o gel ser fixado em solução aquosa de 10% metanol e 5% ácido acético por 2 h sob agitação. A coloração foi realizada em solução de coomassie G-250 até o aparecimento das bandas correspondentes às proteínas.

4.5. Digestão trípica

Proteínas de baixa e alta abundância foram aplicadas nos géis de poliacrilamida unidimensional (1DE) antes da digestão trípica. A eletroforese foi realizada em condições desnaturantes de acordo com o método de Laemmli (1970). O gel de separação usado tinha 1,5 mm de espessura e uma concentração de 10% de poliacrilamida tamponada em Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Cada canaleta recebeu 50 µg de proteínas totais, derivadas de amostras com tampão de amostra composto 17 de Tris-HCl 277,8 mM, pH 6,8, 44,4% de glicerol e 4,4% de SDS. A corrida eletroforética ocorreu a 18.200 V até que as proteínas entrassem em 1,0 cm no gel de separação e a corrida fosse interrompida. O gel foi fixado numa solução aquosa de metanol a 10% e ácido acético a 5% durante 2 h com agitação. A coloração foi realizada na solução de coomassie G250 por 48 h. As manchas de proteína dos géis foram cortadas e previamente descoloridas em solução de bicarbonato de amônia 50 mM / metanol a 50%, seguida de desidratação com acetonitrila. As proteínas foram então reduzidas com solução DTT 200 mM preparada em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56 °C e alquilação com solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min à temperatura ambiente. Os pedaços de géis foram lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM, desidratados com acetonitrila e secos por centrifugação a vácuo. Para a digestão proteolítica, as manchas foram reidratadas com solução de tripsina 20ng / µL por 20h a 37 °C. Os peptídeos digeridos

foram extraídos por três ciclos usando o tampão de extração (50% acetonitrila, 5% ácido fórmico) e secos por centrifugação a vácuo. Os microtubos contendo fragmentos de géis foram novamente submetidos a banho ultrassônico durante 10 min, centrifugados e a solução transferida aos novos microtubos. As soluções contendo os fragmentos trípticos foram concentradas em speed vac até secagem total e armazenados a -20 °C.

4.6. Identificação de proteínas da espuma por espectrometria de massas (LC/MS).

Os peptídeos foram dissolvidos em 0,1% (v / v) de ácido fórmico e analisados por LC-MS usando um sistema nanoUPLC (nanoACQUITY-Waters) contendo uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 uM -100 nm × 100 mm, operando a uma taxa de fluxo de 0,5 uL / min. Os peptídeos eluídos foram injetados automaticamente em um espectrômetro de massa ION TRAP (Amazon-Bruker), online usando uma agulha de ionização nanoESI. A varredura dos íons do espectrômetro de massa foi realizada entre 300 e 1500 m/z no modo positivo e os dados foram adquiridos por 70 min em cada análise LC-MS / MS. O espectrômetro de massa foi operado no modo auto-MSn. A aquisição de dados do instrumento LC-MS foi gerenciada pelo software Hystar (Bruker) e os espectros foram processados com o software Data Analysis (Bruker) usando as configurações padrão para proteômica.

Os espectros foram analisados pelo programa PEAKS 7.0 com licença de Cliente local, conectado a um servidor remoto para identificação de proteínas. Os parâmetros usados no programa foram: banco de sequencias de DNA montadas a partir do sequenciamento do genoma de *Mahanarva spectabilis* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?LinkName=biosample_sra&from_uid=6835179), oxidação da metionina como modificação variável, carbamidometilação de cisteína como uma modificação fixa, uma clivagem perdida, estados de carga de 2+, 3+, 4+ e erro de massa de 0,15 Da. Para a identificação de proteínas, consideramos uma taxa de descoberta falsa (FDR) inferior a 0.1% .

4.7. Análise de metabólitos da glândula salivar de *Mahanarva spectabilis* por LC/MS.

Vinte glândulas salivares de *M. spectabilis* foram adicionadas em tubos eppendorfs contendo 1,0 mL de metanol 80% e ácido fórmico 0.1%. Em seguida foram sonicadas com sonificador de sonda por 3 ciclos de 20s, em gelo. Após incubação de 20 min à 4 °C, os restos

celulares foram removido por centrifugação de 13000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado utilizando uma membrana PVDF descartável de 0,2 mL.

Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi utilizada para análises por LC/MS utilizando o sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EUA), contendo uma coluna trap e uma coluna capilar ProteCol GHQ303 C18 3,0 µm - 300 µm × 150 mm, operando a uma taxa de fluxo de 5,0 µL min⁻¹. Os metabólitos eluídos foram injetados automaticamente no espectrômetro de massa micrOTOF QII (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), funcionando no modo online com uma agulha de ionização microESI. Antes de iniciar as execuções de LC/MS, as amostras foram dessalinizadas automaticamente, on-line acopladas a uma coluna analítica, usando uma coluna C18 armadilha por 10 min a 10 µL / mL de uma fase móvel composta por 5% (B) de acetonitrila e 0,02 % de ácido acético (v / v). As soluções de fase móvel utilizadas neste programa de gradiente foram: (A) água e 0,02% de ácido acético (v / v) e (B) acetonitrila e 0,02% de ácido acético (v / v). O seguinte programa de gradiente foi usado: uma rampa linear crescente começando em 5%, aumentando para 50% (B) por 35 min, 50% (B) por 5 min; uma rampa linear crescente começando em 50%, aumentando para 95% de (B) por 5 min; 95% (B) por 51 min, uma descida gradiente linear começando em 90%, diminuindo para 5% (B) por 5 min, seguido por uma condição estável a 5% (B) por 3 min. A fonte de íons operou a 200 oC, usando gás nebulizador a 0,8 Bar, gás seco a 4,0 Bar e tensão capilar a 4500 V. A varredura de íons para espectros MS1 em modo positivo foi realizada para massas variando entre 100 e 1000 m/z e entre 50 e 1000 m/z para os espectros MS2. Os espectros de MS2 foram adquiridos utilizando um dado dependente da aquisição de MS2 para o pico mais intenso, que apresentou intensidades acima de 2000 au (unidades arbitrárias) e para pico cromatográfico de 1,0 min. O modo MS2 foi operado por AutoMS2 usando gás argônio para fragmentação CID e o modo de escalonamento de colisão para aumento automático da energia de fragmentação.

Os dados foram adquiridos ao longo de 120 min em cada análise LC-MS, utilizando o programa Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e os espectros foram processados através do software DataAnalysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), usando as configurações padrão para metabolômica.

Lista de massas foram geradas no formato genérico (mgf) pelo programa de software Data Analysis, e os metabólitos putativos foram identificados usando a biblioteca NIST, contendo os espectros MS2 para compostos padrão baixados do MassBank da América do Norte e convertidos para o formato NIST (Gouveia et al., 2019).

4.8. Extração do DNA dos insetos.

Insetos inteiros das cigarrinhas foram transferidos para um tubo de 1,5 ml, foram pesados 50 mg e macerados com pistilo em nitrogênio líquido. Logo após a maceração, foi adicionado 750 μ L do tampão de lise CTAB 2% agitando-os levemente. Em seguida, foi incubado em banho maria à 65 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 650 μ L de clorofórmio gelado e os tubos agitados (vertidos) levemente. Em seguida, foi centrifugado a 13.000 RPM por 10 minutos, recolhidos os sobrenadantes e transferidos para novos tubos a 4 °C. Adicionou-se 600 μ L de isopropanol gelado. Então, as amostras foram mantidas por 30 minutos no gelo, submetidas à centrifugação por 10 minutos a 13.000 RPM a 4°C, quando se observa a presença de pellet no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol a 70 %. Novamente foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 RPM a 4°C e descartado o sobrenadante. O pellet foi deixado secando na capela por 10 minutos e foi ressuscitado em 20 μ L de água.

A amostra foi analisada em gel de agarose 1 % com a finalidade de verificar a qualidade e a quantidade de DNA obtida. A eletroforese foi realizada por 40 minutos a 120 V. O gel foi visualizado, em transiluminador acoplado a um microcomputador. Com base na intensidade das bandas de DNA no gel, as amostras foram diluídas 1:50 (98 μ L de H₂O e 2 μ L da amostra de DNA).

OBS: A extração de DNA da glândula de Batelli seguiu o mesmo protocolo acima diferindo apenas na etapa da maceração por nitrogênio líquido. Ao invés da maceração da glândula de Batelli, foi substituída pelo processo de sonicação. Com isso, foram sonicadas com sonificador de sonda por 3 ciclos de 20s, em gelo.

4.9. Amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A PCR foi composta de 1,25 μ L de tampão para PCR 10X, 1,0 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,25 μ L de dNTP 250 μ M, 1 μ L da enzima Taq DNA polimerase, 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador (desenhado manualmente e especificado logo abaixo), 1,5 μ L das amostras de DNA diluídas e água ultra pura tipo I esterilizada para volume final de 12 μ L. As amostras foram levadas ao termociclador automático MyCycler (BioRAD) nas condições de 94 °C por 5 minutos seguido por 45 ciclos compostos por 94°C por 45 segundos, 50 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto. Ao final dos 45 ciclos, um passo adicional a 72°C por 7 minutos

foi empregado. Ao final, as reações permaneceram no termociclador a 4°C até que fossem retiradas do aparelho.

Os resultados foram analisados em gel 1% de agarose em tampão NBC 1X. A eletroforese foi realizada por 40 minutos a 120 V. O gel foi visualizado em transiluminador acoplado a um microcomputador.

Desenho dos primers utilizados na reação da PCR:

PROT1_FW 5'p GCAACGTCTAATGTATCCTTGAC

PROT1_RV 5'p CTTTGAAACTGGACGCCGTGAC

4.10. Bioensaio de Avaliação de Citotoxicidade das Folhas de Capim Elefante.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados conforme metodologia descrita por Berestetskiy, et al. (2008). Foram cortadas secções de folhas bem expandidas de *Pennisetum purpureum* de aproximadamente 2 cm e colocadas em cima de papel de filtro umedecido em placas de petri transparentes. O padrão da toxina Citocalasina B Sigma-Aldrich foram dissolvidas em DMSO (citocalasinas) e levadas à concentração final de 5×10^{-3} M com H₂O bidestilada. A concentração dos solventes foi de 20% (v/v), sendo atóxicos para as folhas de *C. arvensis* e *S. arvensis*. Uma gota da solução teste (10 µL) foi colocada em um dos lados da folha de capim-elefante. A Citocalasina B foi também adicionada às folhas por meio de ferimentos por agulhadas e por injeção direta utilizando uma seringa. As placas de petri tratados foram incubados sob luz artificial e temperatura alternadas: 8 h no escuro a 20 °C e 16 h sob luz a 24 °C. Após 48 h de incubação, a área de necrose foliar será observada.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.

O estudo da composição química da espuma das ninfas tem demonstrado ser importante na formação e estabilização das bolhas (MALYSA; MILLER; LUNKENHEIMER, 1991; MURRAY; ETTELAIE, 2004). Componentes químicos como lipídios, carboidratos e proteínas foram detectados na espuma de *M. fimbriolata* de formas semelhantes a outras espécies de cigarrinhas (TONELLI et al., 2018) e demonstraram funcionar como um surfactante para estabilizá-las, reduzindo assim a tensão superficial. Ácido palmítico, linolênico, pentadecanóico e esteárico são lipídios, de grande importância para a formação e estabilidade das espumas devido às suas forças elásticas (MALYSA; MILLER; LUNKENHEIMER, 1991). Os carboidratos não tem efeito direto na interface ar-água, eles promovem interações entre as proteínas, que criam um filme estável que dá firmeza e estabiliza a espuma (ADEBOWALE; LAWAL, 2003). Proteínas estão envolvidas, especialmente na formação de filmes que reduzem a tensão superficial e aumentam a viscosidade e elasticidade de uma espuma (J. F. ZAYAS, 1997; MARTIN et al., 2002). Como a identificação dos componentes proteicos ainda é desconhecida, sua caracterização iria contribuir para a compreensão da importância da espuma na proteção das cigarrinhas.

5.1. Análise de concentração de proteínas na espuma.

Uma alíquota da espuma produzidas pelas ninfas infestando plantas de capim elefante foi utilizada para determinação da concentração total de proteínas pelo método de Bradford. Para as análises por SDS-PAGE e LC/MS, as proteínas totais da espuma foram precipitadas e concentradas em acetona 80% e em metanol/clorofórmio 10%, obtendo-se sobrenadantes com concentração proteica de 155 µg/mL e 172 µg/mL, respectivamente. Apresentando uma significativa concentração de proteínas que ajudam na estabilização da espuma produzida pela ninfa.

5.2. Perfil de proteínas da espuma por SDS-PAGE LC/MS.

A precipitação por metanol/clorofórmio 10% permitiu uma melhor separação das bandas, destacando-se a presença de uma banda de aproximadamente 60 kDa (**Fig. 3**). Auad et al., (2012) também observou em diferentes amostras de espuma uma proteína com massa

molecular entre 53 e 57 kDa. Na figura 3 é possível observar algumas bandas com massa superior a 97 kDa, como também observado por Auad et al., (2012).

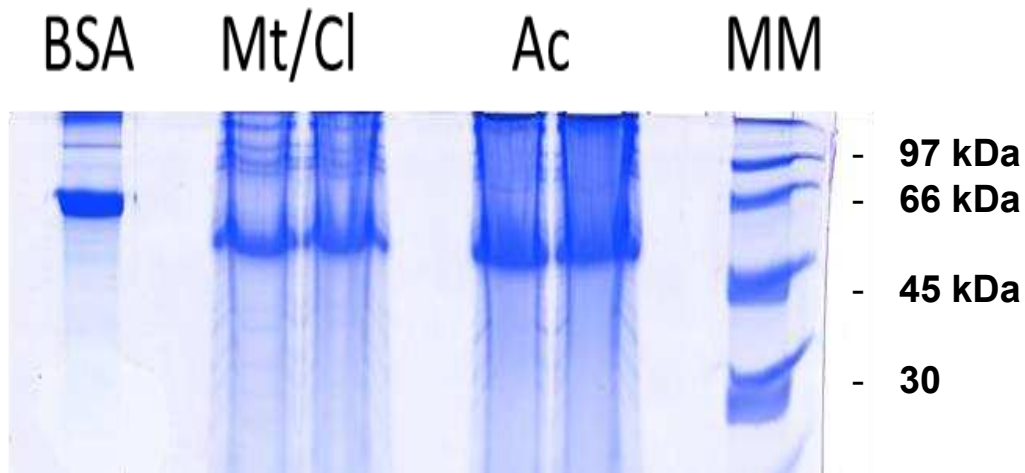
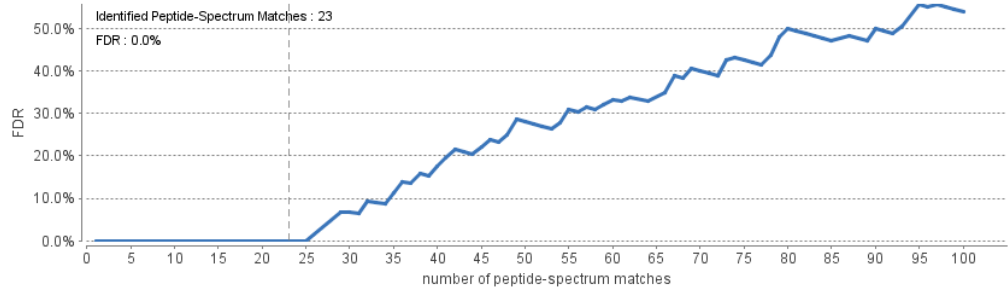


Fig. 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12 %) das amostras de proteínas totais da espuma de *M. spectabilis*. As canaletas correspondem: BSA- Albumina Sérica Bovina, Mt/Cl- Metanol/Clorofórmio 10 %, Ac- Acetona 80 %, MM- Marcador molecular.

Para a identificação das proteínas da espuma as bandas recortadas foram submetidas a clivagem com tripsina para gerar peptídeos trópticos. Os peptídeos trópticos foram analisados por LC/MS e os espectros foram utilizados para a identificação de proteínas utilizando o software PEAKS 7.0. Foram obtidos três contigs identificados (**Fig. 4A**), sendo um contig com maior cobertura com 7 peptídeos únicos (>NODE_1468_length_2853_cov_0.404753) (**Fig. 4B**). O resultado de identificação também indicou que uma cadeia polipeptídica foi majoritária em termos de abundância relativa, como também observado na figura 3.

(A)



Accession	-10lgP	Coverage	Coverage ...	#Peptides	#U...	PTM	Avg. Mass	Description	Mark
NODE_1468_length_28...	140.08	8%	8%	6	6	g s a f h	241262	NODE_1468_length_2853_cov_0.404753	☑
NODE_139546_length_...	91.39	29%	29%	2	2	g	33361	NODE_139546_length_398_cov_0.480...	☑
NODE_88283_length_4...	31.05	4%	4%	1	1		39253	NODE_88283_length_467_cov_0.430636	☑
NODE_99344_length_4...	25.36	6%	6%	1	1		37608	NODE_99344_length_448_cov_0.770642	☑
NODE_158681_length_...	22.88	6%	6%	1	1	g	32271	NODE_158681_length_381_cov_0.284...	☑

(B)

>NODE_1468_length_2853_cov_0.404753

```

1  ATGCAACCCGAAAGTTCGTGATAAAAGACATTGAAATCGGGTGAATAAATAATATTTATTAGTTGATTTAATTATTGTTGCTTACCT
91  GTCACCCGTAGATTTTTAAGGGCCGTTTTTCGCTTGGGCTACACAATTGGCATCAGCACCTAGGGATTCAAACCTCAGCAATTTGTCCTGG
181  CGCTCTGCCACAACCTTTGACAAATGGCTTGTATCATGGCTGGGGAAGCTGCATCGGCTGCAGCCTTGAATTTATTTAATTGTTGGAAT
271  AACATGTTCAATGCATCTGCCAACCACGCGCGCTGCTGCAGCGTCAATTGATTGCAGCAATAGCGGCCTTAGCGATTTTGGTGAAGTTA
361  GGTAGTTCGGTGAATCTGAAACACACACAAGATTTTTAAACAAATATTTTCCAGCTAGTTTTTTGCGTTACATTGATATTCAAAT
451  GCTACTACTTACCTCGGCTACTTTATGCCAGAACGCGAGTCTGCTACAGATTTAGAATTGCACCGGCCCTGTTAAGTTTGTCTACGAG
541  AACGTCCTGTATGCATTGAAGTCTTTGACCGCAACATCCAAGGCTTGCTGAATCTTAGGTTAGTTTATAGCAATGATTTGGATAATTC
631  TTGAACCCCATTTGCCAAGAGTACCAACACAGCAGTTGACGATTTTAGGAAGCACATCTGCACCACTGCAGGTTGATATGCATTTAGTGAT
721  GTTTGTACAATATCTTTGGCAACGCTAAATGTATCCTTGACGAGGACCTCTACAGCCTTGGTTACATTTCTACTTCCCTGACCAAGGG
811  GTTGGCGCACTTTAGAATTTCCACAACACCTGGAATATAATACGATTTGAGACATTTTTTTGACATTAATTTCTTTGTTGATGATATT
901  AAAATGTATATTTATTTTAAAAAATATAATAATTTTTGCACACATTTTACATTTTTTAGAATTTCAATTTGATAGTTGAATACTTTC
991  AGCCACTAACCTTTCAATACTTCTGATGTAAGTTTCCAAACATTTGTGAGAAAGACATGATACAGTTCCAGTCAGCTGTTTAACCGG
1081  TCTGTCACGGCTCCAGTTTCAAAGCGGATTTGAGAGCATCGGCGAGGTTTCCAGGAAGTAGGCCTTTGTAGTACAGAAATCTACAACCTCCT
1171  AGGACAGCATTTAAGGGAGCTTGTAAAGCCTGTTGGAGAGCATCTACGACACCTAGTACCAATTTAAGAACCAGTCCAGAACCTGTTTC
1261  ACTATGTCAAGAACAGTTTTGATGAGTCCCTTCAATGTTTTTTGTAAGTTGTTGACAGTGTCAAGTAAACGTTGGTCACAGCTCCAGTC
1351  AGTCCTTCAACAGCGCCAGTAACCTCCCTAATATTTCCCTACGGGTAGTAGTGCATGGCCAGACGCTGAAACATTTATTTATAATAA
1441  GTATCTAAATACGTAATCTCGTAATTTAATCTTAGTTTTATGTTTTGTAATAACAGTAGATTGTTAACACAAAATTTGTTAAAATTTGATG
1531  AAATGTGAAATGATAAAATGATTCATCAGTAGAATAGCAACATACTGTTATTTTAACAATTAATAAAATATAAAACAAATTTTTTT
1621  AAAAATAAACCTAAGGATCAGAGTTTGTGAAACAGTTCAAATTAATATGCTTTTTTCTTAGTTCTGGATTAATTTCAATTTATTCAAAT
1711  TTAATTTGATTTGAGTATATTTATTGAAACAGAAAGTAATATTTAATTTGATGTAATTTTTTCTCCTCAAGGTTAAAGTATGTTTCATC
1801  CAAAGTGTGTTGTTTTCTTGGACCTCAAGGTGTGTTGATATTCGAATCAGATTTTACTTCCCCCTTCCGTATATTTCTGATCATCCAC
    
```

PTM table:

ΔM	PTM	#
-0.98	Amidation	4
+15.99	Oxidation (M)	2
+27.99	Formylation	2
+14.02	Methylation(OH)	2
+42.01	Acetylation (N-term)	1
-0.98	Amidation	4
+15.99	Oxidation (M)	2
+27.99	Formylation	2
+14.02	Methylation(OH)	2
+42.01	Acetylation (N-term)	1

Fig. 4: Identificação de proteínas da espuma de *M. spectabilis* por LC/MS. Em (A), 25 peptídeos apresentaram *matches* positivos para um FDR de 0,0 %. Em (B) identificação do contig de maior cobertura com 7 peptídeos únicos.

5.3. Análise das sequências identificadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -MS.

As sequências de peptídeos identificados por LC/MS para o contig com maior cobertura foram combinadas para uma pesquisa de similaridade contra o banco NCBI encontrado a sequência listados a seguir:

Supported peptides from >NODE_1468_length_2853_cov_0.404753. AAADAASPAMIQAIVNK-SALKLDAVTDLVK-IQQALDVAVK-SALKLDAVTDLVK-GLLPGNLADALK-SALKLDAVTDLVK-SALKLDAVTDLVK-ERVSIGTR-AVEVLVKDTLDVAK-AVEVLVKDTLDVAK-VSEVQAVTQAASALTAK-TEAVVSSGVQNAATAGMDIINK-TEAVVSSGVQNAATAGMDIINK-AAEAASPAANIQAAVTK-LIELLER-LLEIIER-ILELLER-IQTLAESR-LLIMTTNK-IQAISSER

A pesquisa foi realizada utilizando-se o algoritmo BLAST-MS (link <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>) com as sequências dos peptídeos identificados visando identificar proteínas com similaridade de sequências contra o banco de dados NCBI nr. Foram obtidos resultados significativos para sequências com similaridades para procariotos, apesar da baixa similaridade e cobertura, como indicado na lista do apêndice em anexo. Portanto, a proteína identificada na espuma não possui homólogos descritos nos bancos de proteínas do NCBI.

5.4. Estimativa da massa molecular para o contig traduzido.

A sequência de DNA do contig foi traduzida em uma sequência de proteína utilizando a ferramenta *translate ExPASy* (Expert Protein Analysis System) Proteomics <https://web.expasy.org/translate/> (Fig. 5). A maior *frame* obtida está descrita abaixo.

Results of translation

- Open reading frames are highlighted in red
- Select your initiator on one of the following frames to retrieve your amino acid sequence

Download all the translated frames

5'3' Frame 1

MQPEVRDKRH-NRVNK-YLFSCI-LLCLPVTARFLRAVFAWATQLASAPRDSNSAICAWASATLLTMACIMAGEAASAAAALNLFNCWNNMFNALSEPTAA
 AAASLIAATAALAILVKLGGSSG-I-NTHKIFKTK-FPS-FFALH-YSNATTYLGYFIARSAVCYRF-NCTGLVKEVYENVLYALKCFDRNIQGLLNLRCFSF
 S NDFG-FLNPIAKRYQAVDDERKHICTTDG-YAFSDVLYNIFGNV-CILDEDLYSLGYISYFLDQGVGAL-NFHNTWKYNTI-DIEFL-H-FLCDDIKMYIYF
 -KNI--FLHTEYIE-NFI--LNTFSH-PENTSDVRFPTTLRRHDTVPVSCLTRSVTASSPKADLRASAREPGSRPLVRETTPTAFAKGACKACWRASTP
 STNLRKTSKTCFTMSRTVLMSPSNVSVSCGTVSVITLVTAAPVSPSTAPVTPPNISPTGSSAWPDA-NIIL--VSKLRNLVI-S-FYVL-IQ-IVNKLKLM
 KCENDKMIQSVB-QHTCYFNHYIKL-NNFFKPKKPKDQSLMNSSNYAFLSGLNFIYSNLKLI-VYLLNRK-IFNCM-IFFSQG-SMFIQSVVVELGPOGV
 LIFESEFTSPLPYILLIHT-LLIEHFLKTINPFI-RVPILTRSYSNLNLITLIIILFCKVYKYNKQNI-NKKNLH-INIFIYTVFYLLSEFKIHCST-IYFL
 RYLI-SLQFR-INSTIPLLKEKIWFITKNTHMFSTHCLLESIDFKITIPRF-HDLSEMLQVCRTPPTRVVVSCSLIHN-YETKDFPLIRQLHSFFSGRDR
 KKPSNTHKTAANTLYTRNPPVLTLEISRIYTGASCITSLRLNERARSHIKTAFAR-NVHCSTAPLPRITTYGRRESLQLMNDVPRASENGLSSRIYPPF
 SLFLSAAPDRRSIAGQRR-KKKRVARAHARATC

Fig. 5: Resultado da tradução do contig. As ORFs estão destacadas em vermelho.

Para estimar a massa do frame obtida, toda cadeia polipeptídica gerada foi analisada utilizando a ferramenta *Compute pI/Mw* do ExPASy Proteomics https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool para calcular a massa molecular da proteína em kDa, sendo obtido um valor de 103.121,31 Da

Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

10	20	30	40	50	60
MQPEVRDKRH	NRVNKYLFS	ILLCLPVT	RFLRAVFAWA	TQLASAPRDS	NSAICAWASA
70	80	90	100	110	120
TLLTMACIM	AGEAASAAAL	NLFNCWNNMF	NALSEPTAAA	AASLIAAIAA	LAILVKLGSS
130	140	150	160	170	180
GINTHKIFKT	KFPSFFALHY	SNATTYLYGYF	IARSAVCYRF	NCTGLVKFVY	ENVLYALKCF
190	200	210	220	230	240
DRNIQGLLNL	RCSFSNDFGF	LNPIAKRYQQ	AVDDFRKHIC	TDGYAFSDV	LYNIFGNVCI
250	260	270	280	290	300
LDEDLYSLGY	ISYFLDQGVG	ALNFHNTWKY	NTIDIFLHFL	CDDIKMYIYF	KNIFLHTFYI
310	320	330	340	350	360
FNFILNTFSH	PFNTSDVRF	TTLRHRHDTV	PVSCLTRSVT	ASSFKADLRA	SARFPGSRPL
370	380	390	400	410	420
VRESTPRTA	FKGACKACWR	ASTTPSTNLR	TKSRTCFTMS	RTVLMSPSNV	FVSCGTVSVI
430	440	450	460	470	480
TLVTAPVSPS	TAPVTPPNIS	PTGSSAWPDA	NIILVSKLRN	LVISFYVLIQ	IVNTKLLKLM
490	500	510	520	530	540
KCENDKMIQS	VEQHTCYFNN	YIKLNNFFKN	KPKDQSLMNS	SNYYAFFLSS	GLNFIYSNLK
550	560	570	580	590	600
LIVYLLNRKI	FNCMIFFSQG	SMFIQSVVVF	LGPQGV LIFE	SDFTSPLPYI	LIHTLLIEH
610	620	630	640	650	660
FLKTINPFIR	VPILTRSYSN	LNITLIIILF	CKVYKYNKQN	INKKNNLHIN	IFIYTVFYIL
670	680	690	700	710	720
LSFKIHCSTI	YFLRYLISLQ	FRINSTIPLL	KEKIWFFITK	NTHMFSTHCL	LESIDFKITI
730	740	750	760	770	780
FPRFHDLSEF	LQVCRTPPTT	RVVCSLIHN	YETKDFPLIR	QLHSFFSGRD	RKKPSNTHKT
790	800	810	820	830	840
AANTLYTRNP	PVLVTLREIS	RIYTGASCIT	SLRLNERARS	HIKTAFARNV	HCSTAPLPRI
850	860	870	880	890	900
TTYGRRESLQ	LMNDVPRASF	NGLSSRPIYP	FFSLFLSAAF	DRRSIAGQRR	KKKRVARAHA

RATC

Theoretical pI/Mw: 9.84 / 103121.31

O valor da massa da proteína estimada no gel SDS-PAGE foi aproximadamente 96 kDa (**Fig. 6**), enquanto que o valor da massa da proteína identificada e predita para o contig NODE_1468_length_2853_cov_0.404753 foi de 103.121,31 daltons e está, portanto, próxima da massa observada no gel SDS-PAGE. Entretanto, essa diferença entre a massa molecular no gel e a partir da EST gerada pelo contig, pode ser devido a alterações pós-transcricionais. Como por exemplo, devido ao processamento do mRNA no núcleo, os íntrons são retirados e não estão presentes nas ESTs. Portanto, os dados de LC/MS confirmam que esse contig está codificando esta proteína e essa diferença de massa molecular pode ser que seja um peptídeo sinal ou uma região UTR não codificante. Análise realizada através do programa SignalP-5.0 revelou uma provável presença de peptídeo sinal (**Fig. 7**). O sítio de clivagem para originar a forma madura apresenta-se entre o resíduo alanina da posição 30 e o resíduo arginina da posição 31. Calculando na ferramenta Compute pI/Mw até o ponto de clivagem do peptídeo temos uma massa molecular de 3558.28 daltons (**Fig. 8**). Fazendo a diferença do peptídeo sinal com o peptídeo maduro temos uma massa molecular de 99.562 dalton estimada corroborando com a corrida da banda do gel SDS-PAGE da proteína.

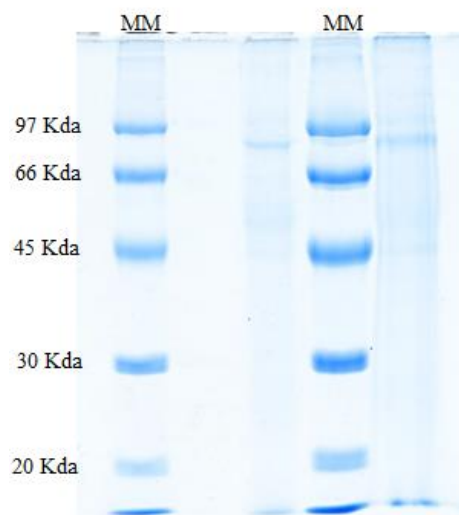


Fig. 6: - Análise eletroforética (SDS-PAGE 12 %) em condições desnaturantes da espuma. As canaletas correspondem: MM- Marcador molecular (kDa) e as amostras de proteínas das espumas precipitadas apresentando bandas aproximadas de 96 kDa.

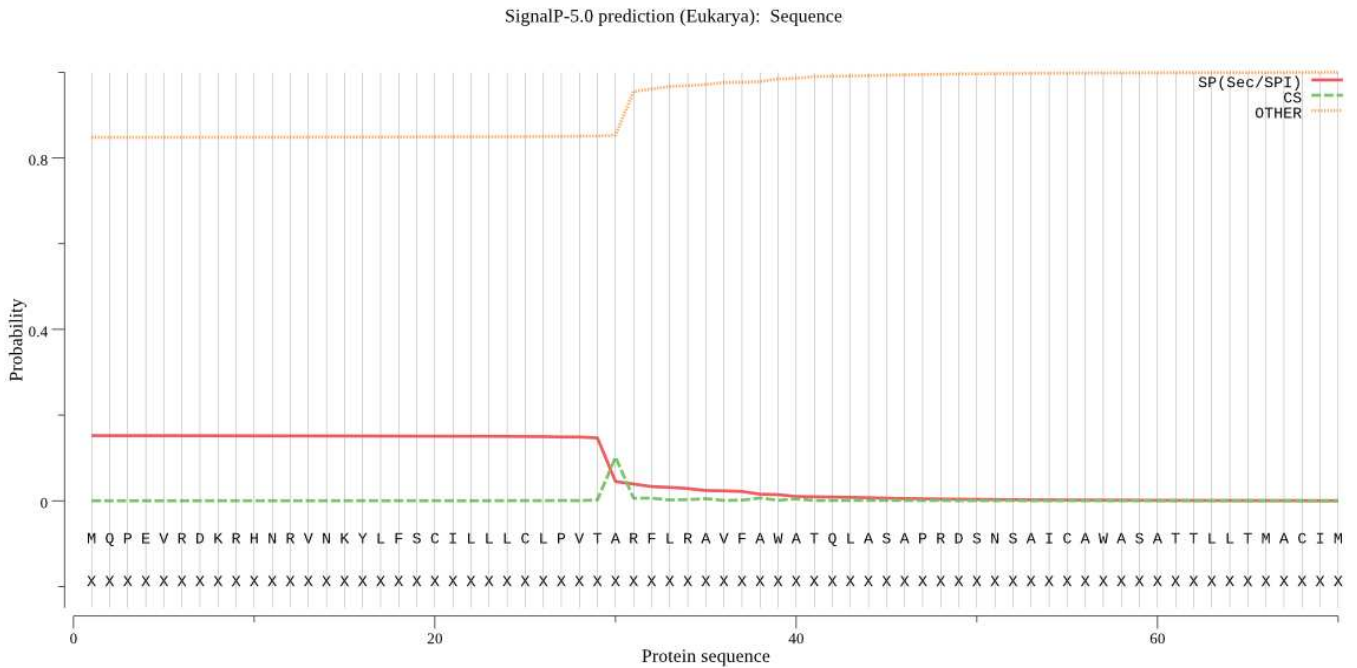


Fig. 7: Análise de probabilidade de peptídeo sinal na sequência aminoacídica. Três probabilidades são relatadas no gráfico, ou seja, *SP (Sec/SPI) / LIPO (Sec/SPII) / TAT (Tat / SPI)* (dependendo de que tipo de peptídeo sinal é previsto), *CS* (a clivagem local) e *OUTROS* (a probabilidade de que a sequência não tenha nenhum tipo de peptídeo sinal). Sec/SPI= 0,1523. Outros= 0,847.

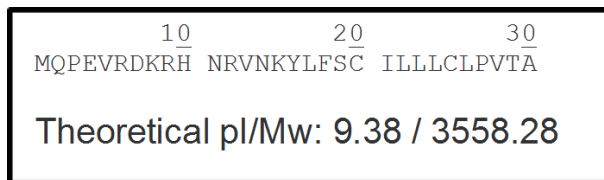


Fig. 8: Fragmento de peptídeo sinal com sua respectiva massa molecular.

5.5. Análise por PCR do contig identificado.

Para confirmação da presença do gene codificante para a proteína identificada por LC/MS foram desenhados manualmente *primers* específicos para a região com maior representação e cobertura dos peptídeos identificados por LC/MS. A posição de anelamento dos *primers* estão indicadas abaixo.

>>NODE_1468_length_2853_cov_0.404753

ATGCAACCCGAAGTTCGTGATAAAAAGACATTGAAATCGGGTGAATAAATAATATTTATTTAGTT
 GTATTTAATTATTGTTGTGCTTACCTGTCACCGCTAGATTTTTAAGGGCCGTTTTCGCTTGGGCTA
 CACAATTGGCATCAGCACCTAGGGATTCAAACCTCAGCAATTTGTGCCTGGGCGTCTGCCACAAC
CTTGTGACAATGGCTTGTATCATGGCTGGGGAAGCTGCATCGGCTGCAGCCTTGAATTTATTTA
 ATTGTTGGAATAACATGTTCAATGCACTGTCCGAACCGACGGCGGCTGCTGCAGCGTCATTGAT
 TGCAGCAATAGCGGCTTAGCGATTTTGGTGAAGTTAGGTAGTTCCGGTTGAATCTGAAACACA
 CACAAGATTTTTAAAACAAAATAATTTCCAAGCTAGTTTTTTCGTTACATTGATATTCAAATGC
 TACTACTTACCTCGGGTACTTTATTGCCAGAAGCGCAGTCTGCTACAGATTTTAGAATTGCACCG
 GCCTTGTTAAGTTTGTCTACGAGAACGCTTGTATGCATTGAAGTGCTTTGACCGCAACATCCAA
 GGCTTGTCTGAATCTTAGGTGTAGTTTAGCAATGATTTGGATAATCTTGAACCCCATTTGCCAA
 GAGGTACCAACAAGCAGTTGACGATTTTAGGAAGCACATCTGCACCACTGACGGTTGATATGCA
 TTAGTGATGTTTTGTACAATATCTTGGCAAACGTCTAATGTATCCTTGACGAGGACCTCTACAG
 CCTTGGTTACAT

5'p GCAACGTCTAATGTATCCTTGAC

TTCTACTTCCTTGACCAAGGGGTTGGCGCACTTTAGAATTTCCACAACACCTGGAAATATAAT
 ACGATTTGAGACATTTTTTTGTGACATTAATTTCTTTGTGATGATATTAATTAATTTATTTT
 TAAAAAATATATAATAATTTTGCACACATTTACATTTTTTAGAATTTTCAATTTGATAGTTGAA
 TACTTTGACCCACTAACCTTCAATACTTCTGATGTAAGGTTTCCAACAACCTTTGTCGAGAAGAC
 ATGATACAGTTCAGTCAGCTGTTTAAACCAGGTCTGTACGGCGTCCAGTTTCAAGCG

3' CAGTGCCGACAGTCAAAGTTTC

GATTTGAGAGCATCGGCGAGGTTTCCAGGAAGTAGGCCTTTAGTCAGAGAATCTACAACCTCCTA
 GGACAGCATTTAAGGGAGCTTGTAAGCCTGTTGGAGAGCATCTACGACACCTAGTACCAATTT
 AAGAACCAAGTCCAGAACCCTGTTTCACTATGTCAAGAACAGTTTTGATGAGTCCTTCTAATGTTT
 TTGTAAGTTGTGGTACAGTGTGAGTAATAACGTTGGTCACAGCTCCAGTCAGTCTTCAACAGC
 GCCAGTAACTCCCCTAATATTTCCCCTACGGGTAGTAGTGCATGGCCAGACGCCTGAAACATT
 ATTTATAATAAGTATCTAAATTACGTAATCTCGTAATTTAATCTTAGTTTTATGTTTTGTAAATA
 CAGTAGATTGTTAACACAAAATTTGTTAAAATTTGATGAAATGTGAAAATGATAAAATGATTCAAT
 CAGTAGAATAGCAACATACTTGTATTTTAAACAATTATAAAAATTAATAAACAATTTTTTAAA
 AATAAACCTAAGGATCAGAGTTTGTGTAACAGTTCAAATTAATTTAGCCTTTTTCTTAGTTCTGG
 ATTAATTTCAATTTATTCAAATTTAAAATTTGATTTGAGTATATTTATTGAACAGAAAGTAAATAT
 TTAATTGATGTAATTTTTTCTCTCAAGGTTAAAGTATGTTTCATCCAAAGTGTGTTGTTTTCC
 TTGGACCTCAAGGTGTGTTGATATTCGAATCAGATTTTACTTCCCCCTTCCGTATAATTCTGATC
 ATCCACACCTGACTTCTAATTGAACATTTCTAAAAACAATAAATCCTTTTATTTAACGCGTCC
 GATACTAACGCGTTCTTACTCAAACCTTAATATAACTTTAATTATAATCTTGTTTTGCAAAAGTTT
 ATAAATATAATAAACAATAATATATAGAACAAGAAAAATAATCTACATTAGATTAATATATTTAT
 ATATACAGTATTTTATATATTATTATCATTTAAAATACACTGCAGTACATAAATCTATTCTTAA
 GATACTTGATTTAGTCTTTACAATTTAGATGAATAAACTCAACAATTCATTACTTAAAGAAAA
 GATCTGGTTTTTTATAACTAAAACACACACATGTTTCTACACATTGTTTATTGGAATCGATAG
 ATTTAAAATCACAATTTTCCACGTTTTTAACATGATCTTTCTTTTATGTTGCAGGTATGTAGAA
 CGACTCTACAACGAGAGTGGTGAGCTGATGCTAATTCACAATTGATACGAAACTAAAGACTT
 TCCATTGATCAGACAATTGCACAGTTTTTCTCCGGAAGAGACAGGAAAAAACCCCTGAATACA
 CACAAGACCGCTGCCAACACCTGTACACGCGTAATCCGCCGTTCTCGTCACTCTTCGCGAAA
 TCTCCCGTATATACACCGGCGCGTGTGATAACAAGCCTCCGATTGAATGAAAAGACCCGAAG
 CCATATCAAACTGCATTGCCCCGTAACCGTGCAGTGCAGTACGGCGCCTCTGCCGCGTATA
 ACGACATACGGAAGGCGAGAGTCTGCTGCAGCTCATGAATGACGTGCCGAGAGCGAGCTTCAAC
 GGACTTTCCTCCCGTCCCATTTACCCTTTTTCTCTCTCTTCTCTCTGACGCTTCGATCGAAGA
 AGCATCGCTGGGCAGAGGAGATGAAAAAAAAGAGAGTGCAGGGGACACGCACGCGCAAC
 CTGT

Desenhos dos primers para síntese laboratorial:

PROT1_FW 5'p GCAACGTCTAATGTATCCTTGAC

%GC (conteúdo de guanina e citosina) = 43.5 %

T_m (Temperatura de anelamento (melting temperature)) com correção de sal = 53.6 °C

Tamanho (pb) = 23

PROT1_RV 5'p CTTTGAAACTGGACGCCGTGAC

%GC (conteúdo de guanina e citosina) = 54.5 %

T_m (Temperatura de anelamento (melting temperature)) com correção de sal = 58.8 °C

Tamanho (pb) = 22

Como indicado na figura, a região de anelamento no contig identificado iria gerar um amplificado por PCR de 399 pb. Já no gel de agarose foram observados 2 amplificados, sendo um por volta de 400 pb e outro por 390 pb mostrada na **figura 19**.

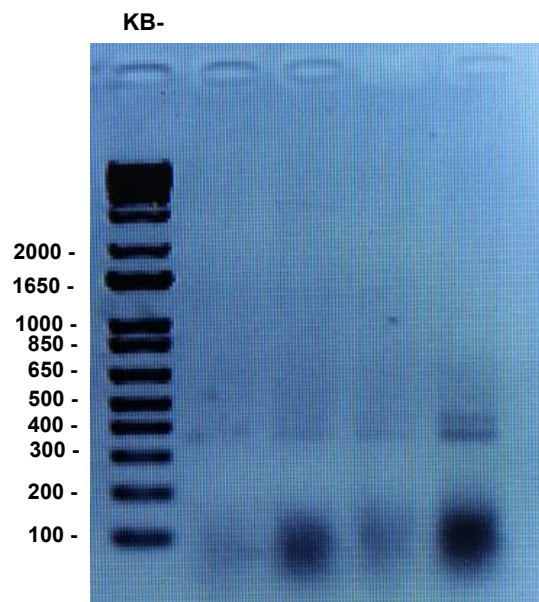


Fig. 9: Eletroforese em gel de agarose 1 % de amplificado (PCR) do DNA do inseto total corado com brometo de etídio com amplificação de 2 fragmentos de 400 e 390 pb.

Portanto, a montagem do contig identificado está correto e apesar de alguma similaridade com bactérias e a não existência de introns, o DNA amplificado parece ser de origem genômica nuclear. A amplificação de duas bandas pode ser em decorrência da existência de mais de uma variante para este gene no genoma. Posteriormente, será interessante fazer um primer para amplificar toda a região do RNAm para sequenciar novamente o contig e para clonagem da região codificante.

A presença do gene foi analisada também por PCR para DNA extraído das glândulas de Batelli. Foi também observado a presença dos mesmos amplificados preditos, sugerindo novamente que o gene é de origem genômica (**Fig. 10**).

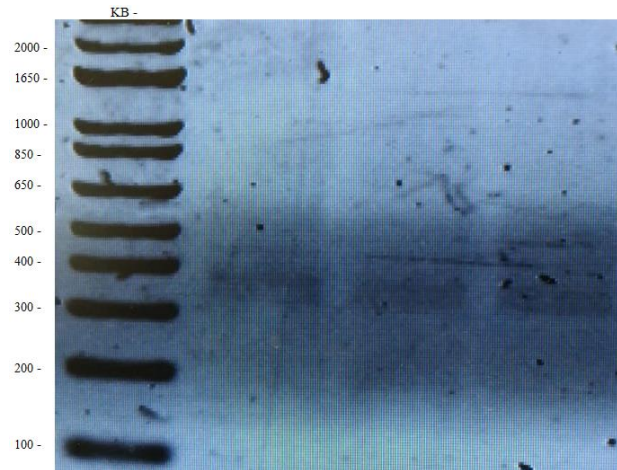


Fig. 10: Eletroforese em gel de agarose 1 % do amplificado (PCR) do DNA extraído da glândula de Batelli corado com brometo de etídio com amplificação de 2 fragmentos de 400 e 390 pb.

5.6. Análise de metabólitos da glândula salivar de *Mahanarva Spectabilis* por LC/MS.

Extratos da glândula salivar da *Mahanarva spectabilis* foram analisados por LC/MS visando identificar componentes envolvidos na produção de sintomas de clorose nas folhas infestadas. Alguns íons foram identificados (dados não mostrados), sendo o íon m/z 480.265 foi observado em alta abundância relativa (**Fig. 11 A**). O espectro de fragmentação do íon 480 foi utilizado para identificação utilizando a biblioteca de metabólitos NIST (**Fig. 11 B**).

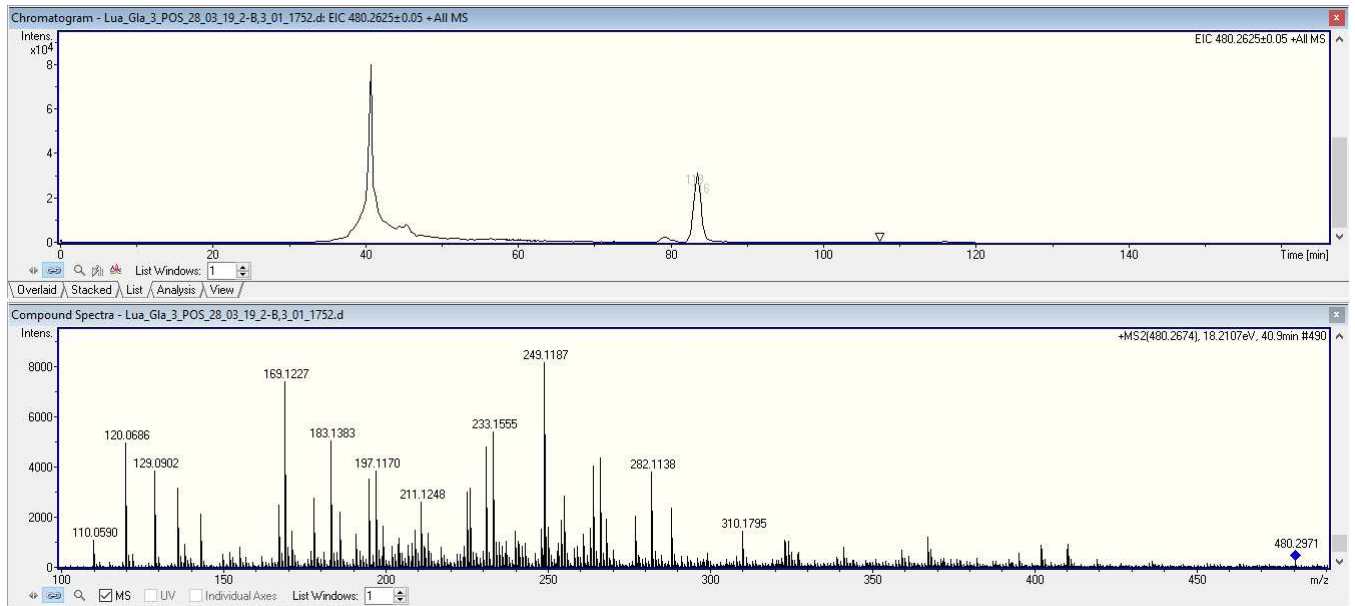


Fig 11: Análise por LC/MS de metabólitos da glândula salivar de *M. spectabilis*. Em (A) o cromatograma extraído (EIC) para o íon m/z 480.2674 presente em alta abundância relativa. Em (B) o espectro de fragmentação MS/MS.

No resultado da NIST foi obtida um alto pareamento (*match*) de fragmentos de MS2 e uma massa molecular próxima para a molécula descrita como Citocalasina B (**Fig. 12**). Portanto, o íon 480 apresentou uma identificação putativa como sendo uma molécula com alta similaridade estrutural com a Citocalasina B.

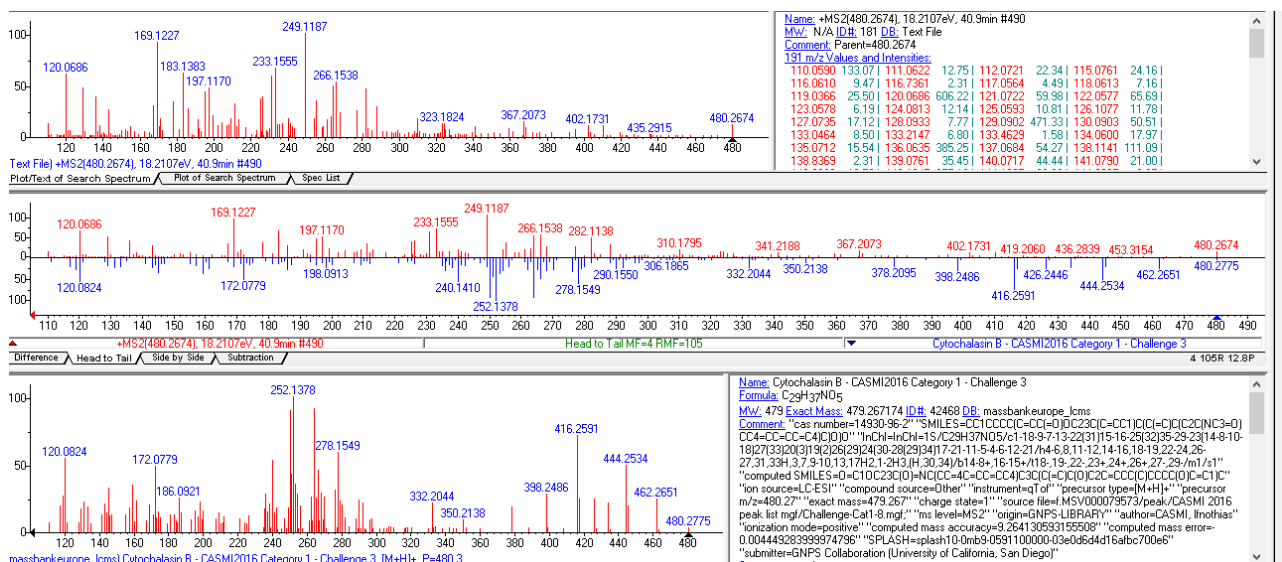


Fig 12: Identificação do espectro de fragmentação do íon 480.2674 presente em alta abundância na glândula salivar de *M. spectabilis*. O pareamento significativo dos espectros de MS2 é indicado para o íon 480 (em vermelho) e para a Citocalasina B (em azul). Na pesquisa foram utilizados um filtro de 10 ppm para o íon parental e de 20 ppm para os íons fragmentos.

A Citocalasina B é um metabólito secundário de características tóxicas geralmente produzidas pelos fungos (micotoxinas) das espécies *Helminthosporium dematioideum* (*Drechslera dematioidea*) e *Coriolus vernicipes*. São permeáveis as células e se ligam aos filamentos de actina, inibindo a polimerização da actina causando ruptura destes filamentos. Essa toxina também inibe o transporte de monossacarídeos através das membranas celulares (GLUT), e inibe o transporte de glicose e a agregação plaquetária (FORSCHER; SMITH, 1988). De acordo com estudos de relação estrutura atividade química realizadas testando a fitotoxicidade das citocalasinas, a presença do grupo hidroxil em C-7 e do grupo funcional em C-20 e a liberdade conformacional do anel macrocíclico parecem ser características estruturais importantes para esse efeito (BOTTALICO et al., 1990; CAPASSO; EVIDENTE; VURRO, 1991; EVIDENTE et al., 2002). Além disso, tem sido observado sintomas de clorose ou até mesmo necrose foliar por efeitos da citocalasina no conteúdo de clorofila, que podem ser explicados por seus efeitos na inibição do movimento dependente da luz dos cloroplastos nas células das folhas (TAKAGI, 2003). De acordo com Berestetskiy, et al. (2008), as citocalasinas afetam os tecidos foliares de *S. arvensis* de forma semelhante a outras plantas sensíveis também.

A presença de um moléculas com similaridade a Citocalasina B, pode indicar a existência de interação endossimbiótica, entre o inseto e estes fungos que podem estar presentes no aparelho bucal. Esta interação pode ajudar a desestabilizar as membranas das células e paredes vegetais com a presença da referida toxina facilitando ao inseto, portanto, acesso aos nutrientes.

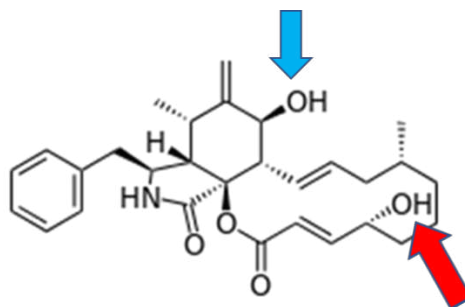
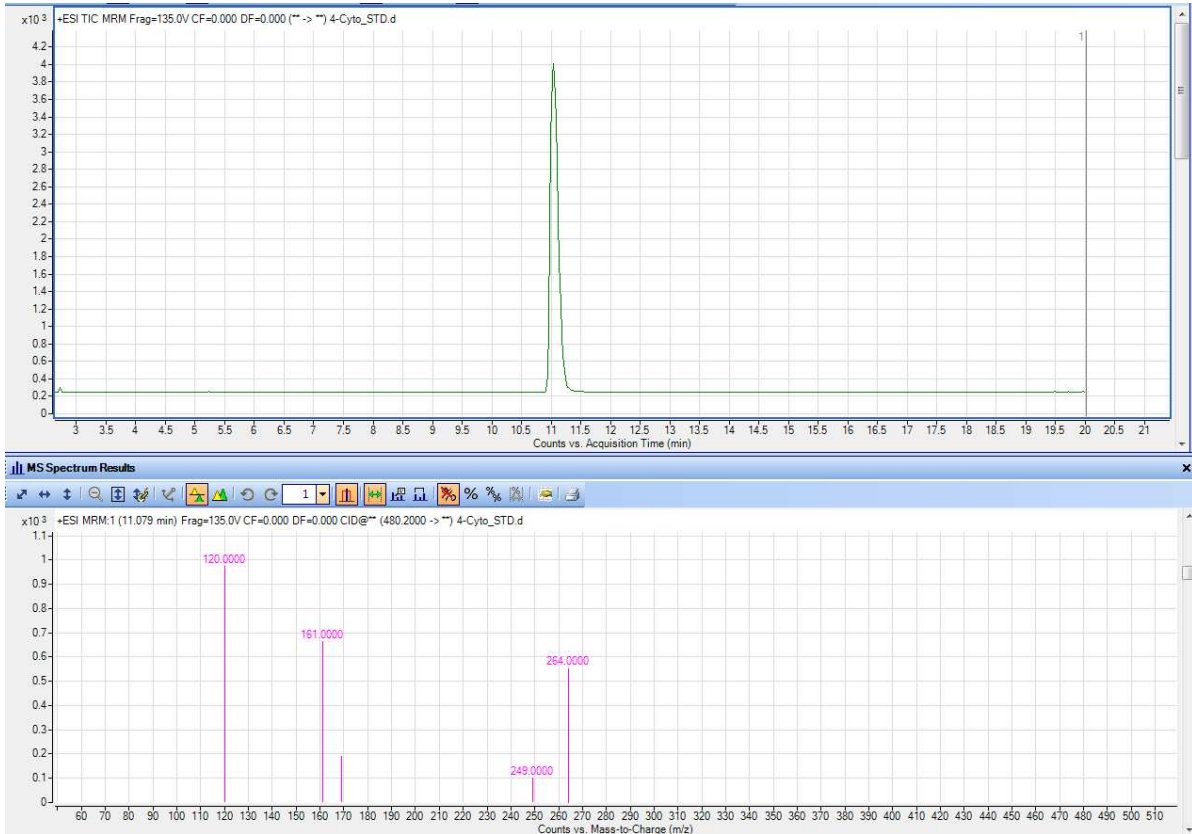


Fig 13: Estrutura química da Citocalasina B ($C_{29}H_{37}NO_5$) que contém vários grupos ceto, hidroxila, uma unidade benzila lipofílica periférica e pertence à classe das lactonas peridroisindolila macrocíclicas. Em destaque na figura, a presença do grupo hidroxila em C-7 (seta azul), o grupo funcional em C-20 (seta vermelha) e a liberdade conformacional do anel macrocíclico importantes para a toxicidade das citocalasinas.

Para investigar o possível envolvimento de uma molécula similar a citocalasina presente na glândula salivar de *M. spectabilis* foi obtido um padrão puro da Citocalasina B de *Drechslera dematioidea* $\geq 98\%$ (HPLC) da Sigma-Aldrich[®]. Inicialmente foi padronizado o método de monitoramento de múltiplas reações (MRM) para o padrão Citocalasina B, visando a confirmação da presença desta molécula nas glândulas. Na figura **14A** temos o tempo de retenção do padrão de 11, 2 min e os respectivos íons de fragmentação monitorados para o padrão puro da Citocalasina B 400 ng/mL. Como esperado as mesmas transições do MRM foram observadas também para a moléculas com m/z 480 Da, entretanto com diferentes tempos de retenção comparados ao padrão da Citocalasina B (**Figura 14 B**).

(A)



(B)

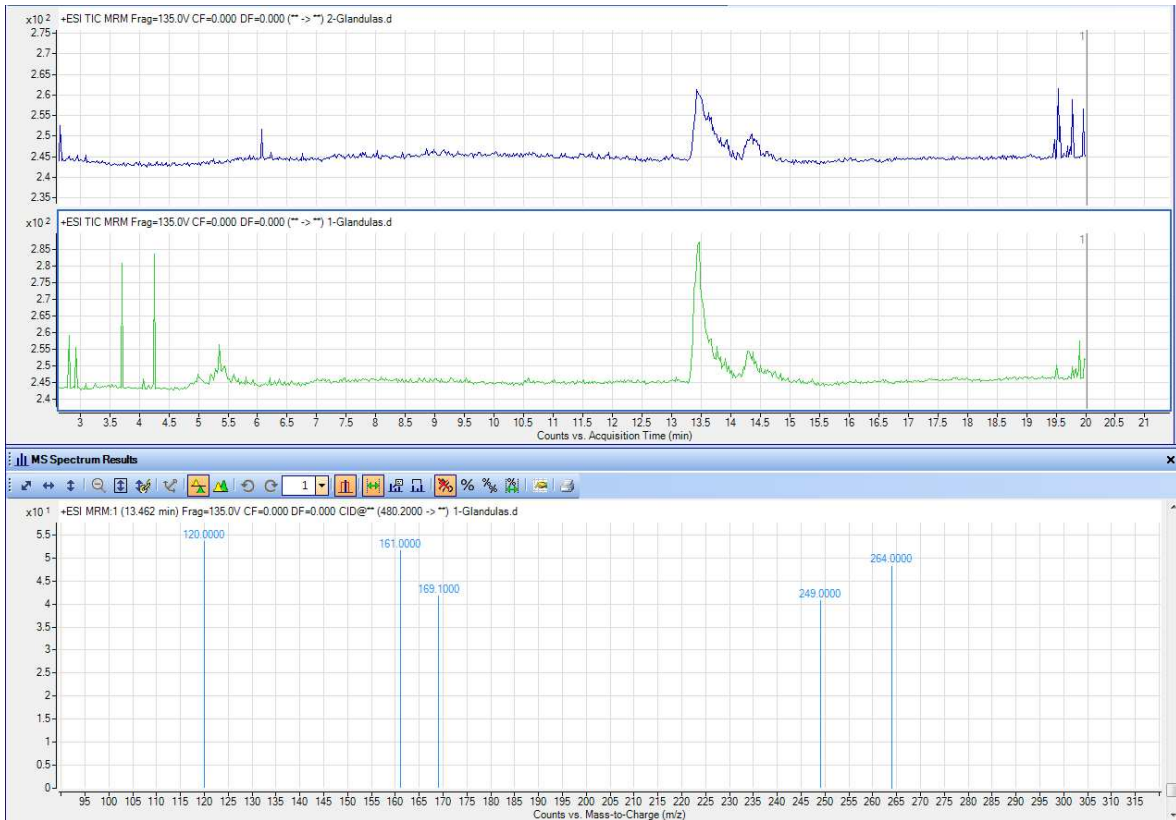


Fig 14: Análise da presença da toxina Citocalasina B em Glândulas salivares de *M. spectabilis* coletadas em 2021 e 2019 (por LC/MS QqQ pelo método de MRM). Em (A) o tempo de retenção (11, 2 min) e os íons fragmentos monitorados para o padrão puro da Citocalasina B 400ng/mL. Em (B) o tempo de retenção (13, 5 min) e os cromatogramas extraídos do íon (EIC) para as 4 transições monitoradas para a amostra glândula 2 (EIC na parte inferior, coletadas em 2021) e glândula 1 (EIC na parte superior coletadas em 2019).

Na figura **14 B** temos o gráfico da amostra da glândula salivar 1 (espectro em cor verde, obtidos para extratos de 2019) e 2 (espectro em cor azul, obtidos para extratos de 2021). Portanto, a molécula com similaridade estrutural para a Citocalasina B esteve presentes em amostras coletadas em épocas distintas.

Comparando as amostras de glândulas salivares 1 e 2 com a Citocalasina B padrão puro temos que glândulas salivares 1 e 2 apresentam tempo de retenção 13,5 min e a Citocalasina B tempo de retenção de 11, 2 min. As amostras de glândulas salivares 1 e 2 apresentam características mais apolares devido ao menor tempo de retenção podendo ser um isômero ou até mesmo um composto diferente do padrão analisado.

A presença da molécula com similaridade estrutural para a Citocalasina B foi analisada também para extratos metabólicos de folhas de capim elefante infestadas pelo inseto adulto. Na figura **15** temos a comparação do padrão puro Citocalasina B 400 ng/mL com folhas de capim-elefante infestadas por insetos *M. spectabilis*. Nestas amostras de folhas fazendo a sobreposição dos cromatogramas do padrão seguindo o tempo de retenção de 11, 2 minutos não foi possível detectar a presença de Citocalasina B-like, pela ausência de sinal do EIC para as transições do MRM. Não foram obtidos sinais significativos para a molécula presente nas glândulas para os cromatogramas de extratos de folhas (**Fig. 12**) quando avaliamos a região com tempo de retenção 13, 5. Portanto, a presença destas moléculas não foi confirmada para os limites de detecção do sistema LC/MS.

Na quantidade de insetos usados no ensaio da infestação de folhas de capim elefante constatou uma baixa presença de toxina detectada nas folhas. Devido a isso, a quantidade desta substância pode estar bastante diluída em relação ao extrato obtido. Portanto, para a confirmação da presença de moléculas produzidas nas glândulas salivares nas folhas de capim elefante serão necessários aumentar o nível de infestação, além de efetuar um enriquecimento antes de injetar os extratos no sistema LC/MS.

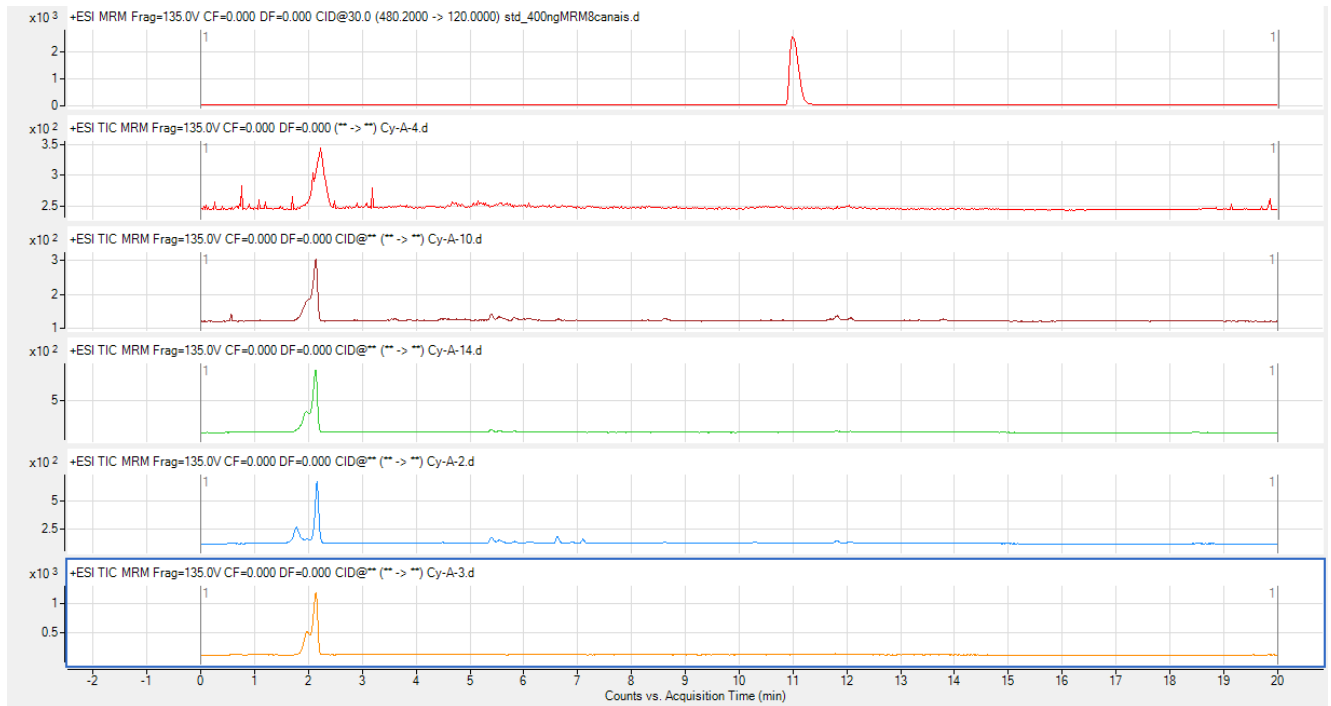


Fig 15: Análise por LC/MS QqQ MRM da presença do íon m/z 480, apresentando identificação putativa para a Citocalasina B, em folhas de capim elefante infestadas por *M. spectabilis*. Na parte superior é indicado o tempo de retenção para o padrão puro Citocalasina B 400ng/mL e nos demais os cromatogramas para as amostras avaliadas.

5.7. Avaliação da Citotoxicidade nas Folhas de Capim Elefante.

A Citocalasina B tem sido descrita em promover atividade fitotóxica em algumas espécies de plantas como, *Cirsium arvense* (L.) Scop. e *Sonchus arvensis* L. (ambos de Asteraceae) comumente chamados de cardo canadense e dente de leão, respectivamente (Berestetskiy, *et al.*, 2008). Com base nessa literatura, foi realizado o experimento de atividade fitotóxica com o capim-elefante.

Neste experimento a molécula pura de Citocalasina B foi aplicada e injetada na folha, juntamente com o padrão e controle, incubados sob luz artificial e por 48 horas. Observou na **Fig. 16** que: em (A) no controle de água não houve alteração da característica foliar. Em (B) com controle de metanol 20% do lado esquerdo da secção da folha foi aplicado 10 μ L e não evidenciando nenhuma alteração visível. Já do lado direito foi injetado com agulha de insulina

10 μ L de metanol 20% apresentado apenas pontos de injúrias provavelmente a lesão mecânica da agulha.

Em (C) foi aplicado (do lado esquerdo) 10 μ L de Citocalasina B e demonstrou que a toxina não foi absorvida ou não apresentou alterações perceptíveis. Do outro lado, foi injetado com seringa de insulina 10 μ L de Citocalasina B evidenciando uma cristalização e não apresentando nenhuma área de necrose.

Podemos concluir que a Citocalasina B não provocou no capim-elefante halo de necrose evidente. Supostamente, as folhas do capim-elefante demonstraram ser mais resistentes ou tolerantes a toxina do que as folhas das *Cirsium arvense* (L.) Scop. e *Sonchus arvensis* L.

Os resultados obtidos nas análises mostraram ser diferentes do experimento de Berestetskiy, et al., 2008 e não houve alterações significativas nos parâmetros testados, presumivelmente pelas diferentes diluições da toxina pesquisadas na folha de capim-elefante.

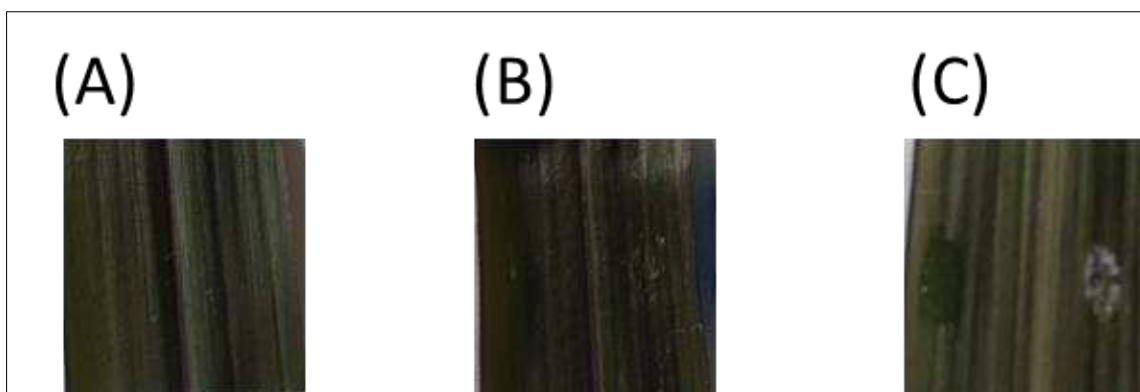


Fig 16: Avaliação da citotoxicidade da Citocalasina B aplicadas numa secção de 2 cm de folhas de Capim Elefante. Em (A) controle com água. Em (B) aplicação do controle com metanol 20 %. Em (C) aplicação da amostra de toxina Citocalasina B Sigma-Aldrich[®] diluído em metanol 20 %.

6. CONCLUSÃO.

- ✓ Foram identificados 25 peptídeos com boa cobertura e matches positivos.
- ✓ Identificação de um contig com maior cobertura com 7 peptídeos únicos.
- ✓ A proteína identificada na espuma não possui similaridade com proteínas de procariotos.
- ✓ A massa molecular da proteína identificada tanto na ferramenta de bioinformática *Compute pI/Mw* quanto o gel SDS-page foram aproximadamente 96 kDa.
- ✓ A PCR tanto do DNA total do inseto quanto para o DNA da glândula de Batelli tiveram os mesmos amplificados sugerindo a expressão da proteína ser de origem genômica nuclear.
- ✓ Espectro de fragmentação do íon 480 encontrado com alto pareamento na biblioteca NIST para Citocalasina B.
- ✓ Comparando as amostras das glândulas salivares do inseto com a Citocalasina B padrão, concluímos que as amostras salivares apresentam características mais apolares devido ao menor tempo de retenção. Com isso levanta-se a possibilidade da existência de uma outra molécula ou composto com similaridade ao da Citocalasina B.
- ✓ Pelo método MRM não foi possível detectar nas amostras de folhas infestadas a presença de Citocalasina B-like,
- ✓ No teste de avaliação citotóxica do capim-elefante demonstrou a possibilidade da folha ser resistente a Citocalasina B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ADEBOWALE, K. O.; LAWAL, O. S. Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 237–246, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Brazilian beef cuts book. **Beef REPORT**, p. 50, 2020.
- AUAD, A. M. et al. Genetic variability of *Mahanarva* sp (Hemiptera: Cercopidae) collected from different sites in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 1005–1010, 2010.
- AUAD, A. M. et al. Spittle protein profile of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) fed various elephant grass genotypes. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 3601–3606, 2012.
- AUAD, A. M.; CARVALHO, C. A. DE. Desenvolvimento E Viabilidade De Ovos De *Mahanarva Spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) Submetidos a Diferentes Regimes De Hidratação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 711–714, 2009.
- BECKETT, K. I. S.; ROBERTSON, A. B.; MATTHEWS, P. G. D. Studies on gas exchange in the meadow spittlebug, *Philaenus spumarius*: The metabolic cost of feeding on, and living in, xylem sap. **Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 3, 2019.
- BERESTETSKIY, A. et al. Nonenolides and cytochalasins with phytotoxic activity against *Cirsium arvense* and *Sonchus arvensis*: A structure-activity relationships study. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 953–960, 2008.
- BOTTALICO, A. et al. Cytochalasins: Structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 93–96, 1990.
- BYERS, R. A.; WELLS, H. D. Phytotoxemia of Coastal Bermudagrass Caused by the Two-Lined Spittlebug, *Prosapia bicincta* (Homoptera: Cercopidae)1. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 59, n. 6, p. 1067–1071, 1966.
- CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; VURRO, M. Cytochalasins from *Phoma exigua* var. *Heteromorpha*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3945–3950, 1991.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA-ESALQ/USP. CEPEA. 2021.
- CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. **The Insects - Structure and Function (5th Ed)**. [s.l: s.n.].
- CHEN, X. et al. The role of biofoam in shielding spittlebug nymphs (Insecta, Hemiptera, Cercopidae) against bright light. **Ecological Entomology**, v. 43, n. 3, p. 273–281, 2018.
- CONGIO, G. F. DE S. Caracterização e quantificação dos danos causados por cigarrinhas adultas do gênero *Mahanarva* sp . (Hemiptera: Cercopidae) em *Brachiaria brizantha* cv Marandu. p. 1–87, 2010.
- DA FONSECA, D. M. et al. Milk production in pasture of elephantgrass under different paddock grazing periods [Produção de leite em pastagem de capim-elefante sob diferentes

- períodos de ocupação dos piquetes]. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 5, p. 848–856, 1998.
- EVIDENTE, A. et al. Cytochalasins Z1, Z2 and Z3, three 24-oxa[14]cytochalasans produced by *Pyrenophora semeniperda*. **Phytochemistry**, v. 60, n. 1, p. 45–53, 2002.
- FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. DE. Production systems - An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 238–243, 2010.
- FORSCHER, P.; SMITH, S. J. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. **The Journal of cell biology**, v. 107, n. 4, p. 1505–1516, 1988.
- GREGG HENDERSON, B.; HOFFMAN, G. D.; JEANNE, R. L. Predation on Cercopids and Material Use of the Spittle in Aphid-Tent Construction by Prairie Ants. **Psyche (New York)**, v. 97, n. 1–2, p. 43–53, 1990.
- GUILBEAU, B. H. The Origin and Formation of the Froth in Spittle-Insects. **The American Naturalist**, v. 42, n. 504, p. 783–798, 1908.
- HAMILTON, K. G. A. **The Insects and Arachnids of Canada**. [s.l: s.n.].
- HOFFMANN, A. et al. Produção de Bovinos de Corte no Sistema de Pasto-Suplemento no Período Seco. **Nativa**, v. 2, n. 2, p. 119–130, 2014.
- IBGE. Censo agropecuário. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.**, v. 7, n. 01036157, p. 1–180, 2017.
- J. F. ZAYAS. Foaming properties of proteins. **Functionality of Proteins in Food**, 1997.
- KOŠTÁL, V. et al. Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 32, p. 8532–8537, 2017.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 726–734, 1970.
- LI, Q. et al. Comparative morphology of the distal segments of Malpighian tubules in cicadas and spittlebugs, with reference to their functions and evolutionary indications to Cicadomorpha (Hemiptera: Auchenorrhyncha). **Zoologischer Anzeiger**, v. 258, p. 54–68, 2015.
- MALYSA, K.; MILLER, R.; LUNKENHEIMER, K. Relationship between foam stability and surface elasticity forces: Fatty acid solutions. **Colloids and Surfaces**, v. 53, n. 1, p. 47–62, 1991.
- MARSHALL, A. T. Spittle-production and tube-building by cercopoid nymphs (Homoptera). 3. The cytology and function of the fibril zone of the Malpighian tubules of tube-building nymphs. **Journal of Cell Science**, v. s3-106, n. 73, p. 37–44, 1965.
- MARSHALL, A. T. Protein synthesis and secretion by the Malpighian tubules of cercopoid larvae (Homoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 19, n. 12, p. 2317–2326, 1973.
- MARSHALL, A. T.; CHEUNG, W. W. K. Studies on water and ion transport in homopteran insects: Ultrastructure and cytochemistry of the cicadoid and cercopoid malpighian tubules and filter chamber. **Tissue and Cell**, v. 6, n. 1, p. 153–171, 1974.

- MARTIN, A. H. et al. Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 254, n. 1, p. 175–183, 2002.
- MELLO, M. L. S. et al. Composition and structure of the froth of the spittlebug, Deois SP. **Insect Biochemistry**, v. 17, n. 3, p. 493–502, 1987.
- MONTEIRO, L. P. et al. Protein and phytohormone profiles of *Mahanarva spectabilis* salivary glands infesting different forages. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 3, p. 1–22, 2021.
- MURRAY, B. S.; ETTOLAIE, R. Foam stability: Proteins and nanoparticles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 314–320, 2004.
- NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Ultrastructural study of the salivary glands of the sugarcane spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Euhemiptera: Cercopidae). **Micron**, v. 37, n. 1, p. 57–66, 2006.
- PARENTE, L. et al. Assessing the pasturelands and livestock dynamics in Brazil, from 1985 to 2017: A novel approach based on high spatial resolution imagery and Google Earth Engine cloud computing. **Remote Sensing of Environment**, v. 232, n. July, p. 111301, 2019.
- PENATI, M. A. et al. Effects of post-grazing forage mass on a beef cattle grazing system on Tanzânia grass pastures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 6, p. 296–300, 2014.
- POLIGNANO, M. V. **Physiological Systems in Insects**. [s.l: s.n.]. v. 53
- RAKITOV, R. A. Structure and function of the Malpighian tubules, and related behaviors in juvenile Cicadas: Evidence of homology with spittlebugs (Hemiptera: Cicadoidea and Cercopoidea). **Zoologischer Anzeiger**, v. 241, n. 2, p. 117–130, 2002.
- RESH, V. H.; CARDE, R. T. **Encyclopedia of insects**. 2. ed. [s.l: s.n.].
- SARAIVA, N. B. et al. Molecular profiling of the *Mahanarva spectabilis* salivary glands and phytohormonal response of elephant grass. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 41, n. 1, p. 849–860, 2021.
- SHIMOYA, A. et al. Repetibilidade de características forrageiras do capim-elefante. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, p. 227–234, 2002.
- SILVA, S. E. B. et al. Biological performance and preference of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) for feeding on different forage plants. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 4, p. 1877–1885, 2017.
- SPAROVEK, G. et al. The revision of the Brazilian forest act: Increased deforestation or a historic step towards balancing agricultural development and nature conservation? **Environmental Science and Policy**, v. 16, p. 65–72, 2012.
- TAKAGI, S. Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 12, p. 1963–1969, 2003.
- TONELLI, M. et al. Spittlebugs produce foam as a thermoregulatory adaptation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2018.
- USDA. Livestock and poultry: world markets and trade. **United States Department of**

Agriculture and Foreign Agricultural Service, n. January, p. 31, 2016.

VALÉRIO, J.; NAKANO, O. Danos causados pelo adulto da cigarrinha *Zulia entreriana* na produção e qualidade de *Brachiaria decumbens*. **Pesquisa agropecuária brasileira (Brasília, 1977)**, v. 23, n. 5, p. 447–453, 1977.

VALÉRIO, J. R. **Cigarrinhas-das-pastagens**. 1. ed. Campo Grande: [s.n.].

VALÉRIO, J. R. Manejo de Insetos-Praga. **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros.**, p. 317–331, 2013.

WHITTAKER, J. B. Cercopid Spittle as a Microhabitat. v. 21, n. 3, p. 59–64, 1970.

WIGGLESWORTH, V. B. **The Circulatory System and Associated Tissues**. [s.l: s.n.].

ZAGO, L. A. et al. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. **Bovinocultura de corte**, p. 375–417, 2010.

ZEDADRA, O. et al. ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Mahanarva spectabilis* COM DIFERENTES FORRAGEIRAS. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2019.

ZHU, Y. C.; YAO, J.; LUTTRELL, R. Identification of genes potentially responsible for extra-oral digestion and overcoming plant defense from salivary glands of the tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) using cDNA sequencing. **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, 2016.

APÊNDICE: Resultado da busca do BLAST-MS:

Database: NCBI nr95 (MS-BLAST)
 144,844,843 sequences; 49,010,334,033 total letters.
 Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100%
 done

Color Key: red = positive hit; green = borderline hit; black = negative result

Summary:

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Total Score
-------------------------------------------------	---------------	----------------

/:WP_136600040.1 hypothetical protein [Rhizobium ipomoeae...	43	203
/:TFU51924.1 hypothetical protein E4T92_03910, partial [P...	46	184
>/:WP_136600040.1 hypothetical protein [Rhizobium ipomoeae]//:THV20579.1 hypothetical protein FAA97_18445 [Rhizobium ipomoeae]/		
Length = 1011		

Total Score: 203

Score = 43 (23.0 bits)
 Identities = 7/11 (63%), Positives = 8/11 (72%)

Query: 71 SALKLDAVTDL 81
 S L +DAV DL
 Sbjct: 736 SDLTIDAVADL 746

Score = 43 (23.0 bits)
 Identities = 7/11 (63%), Positives = 8/11 (72%)

Query: 44 SALKLDAVTDL 54
 S L +DAV DL
 Sbjct: 651 SDLTIDAVADL 661

Score = 43 (23.0 bits)
 Identities = 7/11 (63%), Positives = 8/11 (72%)

Query: 19 SALKLDAVTDL 29
 S L +DAV DL
 Sbjct: 566 SDLTIDAVADL 576

Score = 40 (21.5 bits)
 Identities = 6/9 (66%), Positives = 7/9 (77%)

Query: 87 LKLDVAVTDL 95
 L +DAV DL
 Sbjct: 823 LTIDAVADL 831

Score = 34 (18.5 bits)
 Identities = 5/5 (100%), Positives = 5/5 (100%)

Query: 4 DAASP 8
 DAASP
 Sbjct: 81 DAASP 85

>/:TFU51924.1 hypothetical protein E4T92_03910, partial [Pasteurella sp. WM03]/

Length = 1196

Total Score: 184

Score = 46 (24.4 bits)

Identities = 7/8 (87%), Positives = 7/8 (87%)

Query: 90 DAVTDLVK 97
DAV DLVK

Sbjct: 762 DAVNDLVK 769

Score = 46 (24.4 bits)

Identities = 7/8 (87%), Positives = 7/8 (87%)

Query: 76 DAVTDLVK 83
DAV DLVK

Sbjct: 567 DAVNDLVK 574

Score = 46 (24.4 bits)

Identities = 7/8 (87%), Positives = 7/8 (87%)

Query: 49 DAVTDLVK 56
DAV DLVK

Sbjct: 369 DAVNDLVK 376

Score = 46 (24.4 bits)

Identities = 7/8 (87%), Positives = 7/8 (87%)

Query: 24 DAVTDLVK 31
DAV DLVK

Sbjct: 270 DAVNDLVK 277