

RELAÇÕES HÍDRICAS EM OVOS DE HEXÁPODAS: A  
PROTEÇÃO CONTRA A PERDA DE ÁGUA CONFERIDA PELO  
GENE *ELOVL-4* AO BESOURO *TRIBOLIUM CASTANEUM* E PELA  
CUTÍCULA BLASTODERMAL NOS COLÊMBOLOS *ORCHESELLA*  
*CINCTA* E *FOLSOMIA CANDIDA*

**HELENA CAROLINA MARTINS VARGAS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MAIO - 2019

RELAÇÕES HÍDRICAS EM OVOS DE HEXÁPODAS: A  
PROTEÇÃO CONTRA A PERDA DE ÁGUA CONFERIDA PELO  
GENE *ELOVL-4* AO BESOURO *TRIBOLIUM CASTANEUM* E PELA  
CUTÍCULA BLASTODERMAL NOS COLÊMBOLOS *ORCHESELLA*  
*CINCTA* E *FOLSOMIA CANDIDA*

**HELENA CAROLINA MARTINS VARGAS**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.”

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MAIO - 2019

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V297

Vargas, Helena Carolina Martins.

RELAÇÕES HÍDRICAS EM OVOS DE HEXÁPODAS : A PROTEÇÃO CONTRA A PERDA DE ÁGUA CONFERIDA PELO GENE *ELOVL-4* AO BESOURO *TRIBOLIUM CASTANEUM* E PELA CUTÍCULA BLASTODERMAL NOS COLÊMBOLOS *ORCHESELLA CINCTA* E *FOLSOMIA CANDIDA*. / Helena Carolina Martins Vargas. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

226 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.

Orientador: Gustavo Lazzaro Rezende.

1. Elongases. 2. Cutícula serosa. 3. Cutícula blastodermal. 4. Hexapoda. 5. Terrestrialização. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

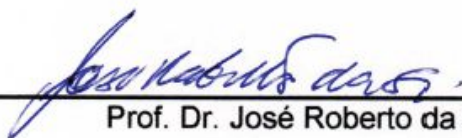
RELAÇÕES HÍDRICAS EM OVOS DE HEXÁPODAS: A  
PROTEÇÃO CONTRA A PERDA DE ÁGUA CONFERIDA PELO GENE  
ELOVL-4 AO BESOURO TRIBOLIUM CASTANEUM E PELA  
CUTÍCULA BLASTODERMAL NOS COLÊMBOLOS ORCHESELLA  
CINCTA E FOLSOMIA CANDIDA

HELENA CAROLINA MARTINS VARGAS

"Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia."

Aprovada em: 27/05/2019

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. José Roberto da Silva – UFRJ/Macaé



Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Olga Lima Tavares Machado – UENF/CBB



Prof. Dr. Thiago Motta Venâncio – UENF/CBB



Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende – UENF/CBB  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico ao meu orientador, Dr.  
Gustavo Lazzaro Rezende**

**“Você não é você. Você é a soma das pessoas que passaram pela sua vida.”**

**Prof. Dr. Andreino Campos**

## AGRADECIMENTOS

Às leis que regem a vida. Obrigada por essa passagem de muitos desafios e aprendizados.

À minha mãe, Maria Helena Martins e minha avó, Severina dos Santos, por serem minha base, por todo amor, por todo apoio e por toda dedicação.

Ao meu grande amigo, Felipe Steinhagem, por ser a pessoa mais gentil e amável do mundo.

Às minhas amigas da república “Bl. 5 203”, Loise Lopes, Ojana Bravin e Rafaela Screnci-Ribeiro.

Ao Albert Angelats pelo companheirismo, carinho e dedicação.

Aos amigos que fiz em Amsterdam: Catarina Netto, Lívia Pitombeira, Catina Prochnow, Cláudia Lima e Rita Bicho.

A todos os amigos do LQFPP que fazem do departamento um ambiente de trabalho extremamente agradável. Em especial ao Kayan Ventury, por ser sempre tão afável e solícito.

Aos professores que passaram na minha vida e me mostraram a beleza da profissão. Em especial aos professores do LQFPP, Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio, Dr<sup>a</sup>. Olga Machado, Dr<sup>a</sup>. Clícia Grativol, Dr. Thiago Venâncio, Dr. Jorge Hernandez, Dr<sup>a</sup>. Kátia Valevski e Dr. Gustavo Rezende por todo suporte dado para a execução desta tese.

Ao Dr. Fábio Olivares e a Dr<sup>a</sup>. Letícia Oliveira por cederem seu laboratório e equipamentos para a execução dos experimentos.

À Dr<sup>a</sup>. Josiana Gomes por aceitar ser revisora deste trabalho e também pelos anos de amizade e suporte.

À Dr<sup>a</sup>. Denise Valle e Dr<sup>a</sup>. Luana Farnesi por serem profissionais exemplares e por todos os ensinamentos sobre ciência e vida. Obrigada por serem lanternas em meio à escuridão. “*You can't be what you can't see* (Marian Wright Edelman).”

Ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da UENF e a todos os seus professores.

A *Vrije Universiteit Amsterdam*, ao *Department of Ecological Science*, à Janine Marien e à Dr<sup>a</sup>. Maartje Liefiting pelo apoio técnico durante a execução dos experimentos realizados durante o doutorado sanduíche.

Ao Dr. Dick Roelofs por ceder seu laboratório e tempo durante meu doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento, ao Dr. Sidnei Mateus, à M.Sc Amanda Prato da Silva e aos demais membros do grupo de pesquisa do Prof. Fábio, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto por toda a ajuda na execução e análise dos experimentos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Gostaria de reiterar aqui meu agradecimento a Amanda por me receber tão bem em seu laboratório e por dividir a “marmitta” comigo por diversos dias. Eu não poderia ter me sentido melhor acolhida.

Ao meu orientador Dr. Gustavo Lazzaro Rezende pelos longos anos de trabalho e parceria. Muito obrigada por todo apoio e todo aprendizado.

Às agências financiadoras do projeto: CAPES e FAPERJ.

Aos membros da banca.



## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XXI</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XXIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>25</b>
1.1. FILO ARTHROPODA .....	25
1.2. SUBFILO HEXAPODA E AS CARACTERÍSTICAS QUE PERMITIRAM A PERMANÊNCIA DO GRUPO NO AMBIENTE TERRESTRE .....	28
1.2.1. <i>A presença de um exoesqueleto rico em lipídeos</i> .....	30
1.2.2. <i>Sistema respiratório internalizado</i> .....	31
1.2.3. <i>Sistema de excreção</i> .....	32
1.2.4. <i>Cascas dos ovos de Hexapoda</i> .....	33
1.3. A ESTRUTURA DA CASCA DOS OVOS DE ORIGEM MATERNA .....	33
1.4. A ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DAS CUTÍCULAS QUE COMPÕEM A CASCA DOS OVOS DE HEXAPODA ---	34
1.4.1. <i>Cutícula serosa</i> .....	34
1.4.2. <i>Cutícula blastodermal</i> .....	37
1.5. O PAPEL FISIOLÓGICO DAS CAMADAS DA CASCA DE ORIGEM PÓS-ZIGÓTICA PARA A CONQUISTA DO AMBIENTE TERRESTRE .....	38
1.5.1. <i>Cutícula serosa de insetos</i> .....	38
1.5.2. <i>Cutícula blastodermal de Collembola</i> .....	40
<b>2. JUSTIFICATIVA E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>42</b>
<b>4. CAPÍTULO I – O GENE TC-ELOVL04 PROTEGE OVOS DE TRIBOLIUM CASTANEUM CONTRA A PERDA DE AGUA</b> .....	<b>43</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	44
4.1.1. <i>Modelo de estudo: coleóptera T. castaneum</i> .....	44
4.1.2. <i>Ácidos graxos</i> .....	48
4.1.3. <i>Os genes elovl</i> .....	54
4.2. OBJETIVO .....	57
4.2.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	57
4.3. METODOLOGIA .....	58
4.3.1. <i>Manutenção de Tribolium castaneum em laboratório</i> .....	58
4.3.2. <i>Obtenção de ovos</i> .....	58
4.3.3. <i>Determinação da formação da cutícula serosa a partir da digestão por solução de hipoclorito de sódio</i> .....	59
4.3.4. <i>Definição dos grupos controles e experimentais</i> .....	59
4.3.5. <i>Síntese de RNA dupla fita (dsRNA)</i> .....	60

4.3.6. Injeção de dsRNA em fêmeas de <i>T. castaneum</i> -----	61
4.3.7. Avaliação do fenótipo do silenciamento gênico -----	62
4.3.8. Efeito do silenciamento gênico para na sobrevivência das larvas-----	64
4.3.9. Fixação de ovos sem casca-----	64
4.3.10. Marcação nuclear com DAPI-----	64
4.3.11. Confirmação do silenciamento gênico de <i>Tc-elovl04</i> através de RT-PCR-----	65
4.3.12. Verificação do silenciamento gênico de <i>Tc-elovl04</i> através de PCR em tempo real-----	68
4.3.13. Caracterização da sequência predita de aminoácido oriunda do gene <i>Tc-elovl04</i> -----	69
4.4. RESULTADOS -----	70
4.4.1. A cutícula serosa de <i>T. castaneum</i> é estabelecida a partir de 14 horas de embriogênese a 30 °C -----	70
4.4.2. Estabelecimento de condições de silenciamento gênico via dsRNA em <i>T. castaneum</i> ----	71
4.4.3. O silenciamento gênico grupal de <i>Tc-elovl01-04</i> e seu efeito embrionário letal dependente da quantidade de dsRNA injetada -----	78
4.4.4. O silenciamento gênico na cepa Georgia de <i>T. castaneum</i> dura por até 41 dias -----	81
4.4.5. O silenciamento gênico em conjunto para <i>Tc-elovl</i> afeta a sobrevivência das larvas após a eclosão -----	83
4.4.6. O gene <i>Tc-elovl04</i> é importante para proteger ovos de <i>T. castaneum</i> em condição de baixa umidade -----	84
4.4.7. O efeito do silenciamento de <i>Tc-elovl04</i> não é alterado frente à variação da quantidade de dsRNA -----	85
4.4.8. O silenciamento gênico grupal de <i>Tc-elovl01</i> , <i>Tc-elovl03</i> e <i>Tc-elovl04</i> afeta viabilidade em baixa umidade relativa-----	86
4.4.9. Confirmação do silenciamento gênico de <i>Tc-elovl04</i> através de RT-PCR -----	87
4.4.10. Verificação do silenciamento gênico de <i>Tc-elovls</i> através de RT-qPCR-----	90
4.4.11. Caracterização da sequência proteica de <i>Tc-ELOVL04</i> -----	92
4.5. DISCUSSÃO-----	94
4.5.1. A formação da cutícula serosa de <i>T. castaneum</i> -----	94
4.5.2. A concentração e o tamanho de dsRNA injetada em <i>T. castaneum</i> -----	95
4.5.3. O fenótipo do RNAi de <i>Tc-zen1</i> na embriogênese de <i>T. castaneum</i> -----	97
4.5.4. O fenótipo do RNAi em conjunto de <i>Tc-elovl</i> e individuais de <i>Tc-elovl01</i> , <i>Tc-elovl02</i> , <i>Tc-elovl03</i> e <i>Tc-elovl04</i> -----	97
4.5.5. Durabilidade do RNAi na embriogênese de <i>T. castaneum</i> -----	103
4.5.6. O fenótipo do RNAi na sobrevivência das larvas eclodidas-----	103
<b>5. CAPÍTULO II – A IMPORTANCIA DA CUTÍCULA BLASTODERMAL PARA A PROTECAO DE COLLEMBOLA -----</b>	<b>105</b>
5.1. MANUSCRITO -----	106
<i>Abstract</i> -----	106
<i>Introduction</i> -----	107
<i>Methods</i> -----	111

<i>Results</i> -----	114
<i>Discussion</i> -----	118
<i>Concluding remarks</i> -----	123
<i>Acknowledgments</i> -----	124
<i>Supplementary material</i> -----	124
<b>6. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS</b> -----	<b>127</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> -----	<b>132</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> -----	<b>133</b>
<b>APÊNDICE A</b> -----	<b>145</b>
1. INTRODUÇÃO-----	145
2. METODOLOGIA-----	146
2.1 <i>Coletas dos ovos</i> -----	146
2.2 <i>Extrações dos HCs com hexano</i> -----	147
3. RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO -----	148
3.1. <i>Hidrocarbonetos encontrados na superfície de ovos selvagens e silenciados com 0-6 horas de idade</i> -----	149
3.2. <i>Compostos identificados na superfície de ovos selvagem e silenciados com 14-24 de idade</i> -----	155
4. REFERÊNCIAS-----	161
<b>ANEXO I</b> -----	<b>163</b>
<b>ANEXO II</b> -----	<b>209</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I:

**Figura 1: Relação filogenética do Filo Arthropoda com a estimativa do tempo de divergência entre os grupos e o percentual do número de espécies.** Os períodos de divergência são baseados em estimativas de medianas de vários estudos feitas pelo sítio timetree.org, acessado em 27/03/2019. Os valores na porção à direita indicam percentagem de espécies em relação ao número total de espécies de animais vivos, estimado por Zhang (2011), que é de 1.527.600. Collembola, Protura e Diplura constituem o taxon "Entognatha". "Crustacea" e "Entognatha" são grupos parafiléticos (Misof *et al.*, 2014) MA: milhões de anos. Imagem gentilmente cedida por Gustavo Rezende.....25

**Figura 2: A diversidade morfológica do Filo Arthropoda.** A: *Pycnogonum rickettsi* (Schmitt 1934) (Chelicerata). B: *Danaus plexippus* (Linnaeus 1758) (Hexapoda). C: *Scolopendra gigantea* (Linnaeus 1758) (Miriapoda). D: *Limulus polyphemus* (Linnaeus 1758) (Chelicerata). E: *Damen* sp. (Koch 1850) (Chelicerata). F: *Danielopolina* sp. (Kornicker and Sohn 1976) (Crustacea). G: *Calliphora vomitoria* (Linnaeus 1758) (Hexapoda). H: *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896) (Crustacea). I: *Vespula vulgaris* (Linnaeus 1758) (Hexapoda). J: *Triops cancriformis* (Bosch 1801) (Crustacea). K: *Pollicipes polymerus* (Sowerby 1883) (Crustacea). L: *Odontodactylus scyllarus* (Linnaeus 1758) (Crustacea). M: um representante da classe Symphyla (Miriapoda). Retirado de Legg (2013).....27

**Figura 3: Eras e períodos geológicos e surgimento dos primeiros seres terrestres multicelulares.** Eras do Paleozóico, Mesozóico e Cenozóico (Ceno) indicam o período de tempo compreendido entre 541 milhões de anos (MAA) atrás e o tempo atual. Essas eras são divididas nos seguintes períodos (descritos em ordem cronológica): Cambriano (Cam), Ordoviciano (O), Siluriano (S), Devoniano (D), Carbonífero (Car), Permiano (Per), Triássico (Tr), Jurássico (J), Cretáceo (K), Paleoceno (Pal) e Eoceno (N). Baseado em Rota-Stabelli *et al.* (2013) e Knoll e Nowak (2017).....28

**Figura 4: Esquema generalizado do tegumento de Hexapoda.** O tegumento é composto de uma monocamada epidérmica, seguido de uma matriz extracelular complexa, formada por uma procutícula mais interna e uma epicutícula, mais externa. A pró-cutícula é dividida em: endocutícula, camada mais interna rica em quitina e proteínas; mesocutícula, região com proteínas sem a presença de quitina; e exocutícula, porção mais externa que confere a rigidez do sistema. A epicutícula é rica em proteínas e lipídeos que garantem a impermeabilização. Adaptado de Klowden (2013). .....31

**Figura 5: Principais grupos de lipídeos que ocorrem na epicutícula de alguns insetos.** As diferentes espécies químicas são mostradas como porcentagem de lipídeo total em diferentes espécies de insetos. Em gafanhotos, predominam hidrocarbonetos, em lagartas, álcoois e em Plecoptera adulto, ácidos graxos livres. Adaptado de Chapman *et al.* (2013). .....31

**Figura 6: Tipos de espiráculos em insetos.** A: Arranjo de espiráculos distribuídos pelo corpo do animal. B: Arranjo com dois espiráculos funcionais. As ramificações do sistema traqueal (túbulos com calibre menor que o tronco principal que é ligado

diretamente aos espiráculos) garantem a troca gasosa em todas as regiões do corpo. Adaptado de Klowden (2013). .....32

**Figura 7: Esquema das camadas da casca de origem maternal de ovos de Hexapoda.** A: *Drosophila melanogaster* e B: *An. albitarsis*, dois exemplos em insetos, com espessura de casca de 3 e 1,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente. C: *H. succinea* e D: *H. nitidus*, dois exemplos em colêmbolos, com espessura de casca de 1,1 e 0,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Esquema A adaptado de Rezende *et al.* (2016); esquemas B, C, D baseados segundo descrições de Monnerat *et al.* (1999) e Larink e Bilinski (1989). .....34

**Figura 8: Processo de formação da cutícula serosa durante a embriogênese inicial de insetos.** Desenhos esquemáticos de seções transversais do meio do embrião. O blastoderma celular diferencia-se nas células da serosa, âmnio e do embrião. As células da serosa passam a envolver o embrião por completo e então secretam a cutícula serosa. Adaptado de Rezende *et al.* (2016). .....35

**Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão da cutícula serosa de *Tribolium castaneum*.** A barra vermelha indica a espessura da cutícula. O corte transversal mostra na porção interna as células da serosa. Seguida da endocutícula, composta de quitina e provavelmente proteínas, região estratificada, espessa e com lâmelas com eletrodensidade alternada. A camada mais externa é a epicutícula que seria composta por proteínas e lipídeos. Barra de escala = 0,5  $\mu\text{m}$ . Adaptado de Rezende *et al.* (2016). .....35

**Figura 10 Cutícula serosa de ovos de *T. castaneum*.** A: ovos selvagens. B: ovos silenciados para quitina sintase 1. E: embrião, A: âmnion, S: serosa, CS: cutícula serosa, MV: membrana vitelínica (uma das camadas da casca de origem materna). Adaptado de Jacobs *et al.* (2013). .....36

**Figura 11: Processo de formação da cutícula blastodermal durante a embriogênese inicial de Collembola.** Desenhos esquemáticos de seções transversais do meio do embrião. O blastoderma celular secreta a cutícula blastodermal. O aumento do volume dos ovos acarreta o rompimento da parte materna da casca, originando os *polar caps* (setas azuis). O blastoderma se diferencia em células do embrião e extra-embriônicas. A cutícula blastodermal passa a proteger o embrião. Em outras espécies, primeiro o blastoderma se diferencia para depois produzir a cutícula blastodermal. Adaptado de Rezende *et al.* (2016). .....37

**Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão da cutícula blastodermal de *A. maritima*.** A barra vermelha indica a espessura da cutícula. Setas brancas e pretas indicam, respectivamente, as camadas claras e escuras da endocutícula. A seta azul indica a epicutícula, delgada e eletro densa. Barras de escala: 1  $\mu\text{m}$ . Retirado de Tamarelle (1981). .....38

**Figura 13: Percentual de eclosão de ovos expostos a diferentes umidades relativas a 35°C.** Estão representadas as taxas de eclosão dos grupos de ovos selvagens (círculos pretos), ovos de fêmeas injetadas com dsRNA inespecífico (sequência de plasmídeo vetor) (quadrados cinza), ovos silenciados para *Tc-zen1* (triângulo cinza) e ovos silenciados para *Tc-chs1* (hexágono cinza). As barras indicam o erro padrão entre 3 a 10 réplicas de 96 ovos cada. Retirado de Jacobs *et al.* (2013). .....40

- Figura 14: Estágios de vida do besouro *Tribolium castaneum*.** O ciclo de vida consiste em: ovo, seis instares larvais, pré-pupa, pupa jovem, pupa madura, adulto recém-emergido e adulto maduro. Os diferentes estágios não estão na mesma escala. Adaptado de Walski *et al.* (2016). .....45
- Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura dos lóbulos genitais de pupas macho e fêmea.** A pupa fêmea - à esquerda - distingue-se pelos lobos genitais salientes (circulado em amarelo). Na pupa macho - à direita - não ocorre essa saliência. Retirado de Dickinson (2018). .....45
- Figura 16: Embriogênese de *T. castaneum*.** Nas imagens de microscopia de fluorescência cada ponto branco indica um núcleo celular. Em todas as imagens a região anterior está para esquerda, posterior pra direita, parte dorsal pra cima e parte ventral pra baixo. Os planos mostram os quatro grandes eventos do desenvolvimento: A: gastrulação; B: alongamento (extensão) da banda germinal; C: retração da banda germinal e D: fechamento dorsal. Regiões pseudo coloridas em vermelho indicam células da serosa (A3 e D1); em verde indicam o embrião e o âmnio (A3). A marcação em laranja (B1) indica o estágio de formação da cutícula serosa. Nos painéis B e C as células da serosa também se encontram na parte ventral do ovo, apesar das imagens não mostrarem isso com clareza. As barras indicam 100  $\mu\text{m}$ . Imagens adaptadas de Strobl e Stelzer (2014). .....47
- Figura 17: Esquema da estrutura de dois ácidos graxos com 18 carbonos.** A: Ácido esteárico (ácido graxo saturado). B: Ácido oleico (ácido graxo insaturado, do tipo *cis*). Retirado de Nelson e Cox (2014). .....48
- Figura 18: Estrutura do complexo enzimático da enzima ácido graxo sintase do tipo I.** A: Estrutura quaternária da enzima, que atua como um homodímero. B: Arranjo linear dos domínios da enzima. KS:  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintase; MAT: malonil/acetil-CoA-ACP-transferase; DH:  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-desidratase; ER: enoil-ACP-redutase; KR:  $\beta$ -cetoacil-ACP-redutase; ACP: proteína carreadora de grupos acila; e TE: tioesterase. Retirado de Nelson e Cox (2014). .....49
- Figura 19: Estrutura do Malonil-CoA e do Acetil-CoA.** Retirado de Nelson e Cox (2014). .....50
- Figura 20: Esquema da via de síntese de ácidos graxos mediada pela FAS I.** Esquema mostra a primeira rodada da via de síntese a partir do malonil-CoA e acetil-CoA até a formação de uma molécula de quatro carbono, butiril-ACP. O processo ocorre em quatro etapas. 1: condensação, 2: redução, 3: desidratação e 4: redução. Adaptado de Nelson e Cox (2014). .....51
- Figura 21: Via de alongamento de ácidos graxos.** R: cadeia com 15 carbonos. Adaptado de Bond *et al.*, (2016). .....52
- Figura 22: Via de alongamento de AG a partir de palmitato e substratos específicos de ELOVL de mamíferos.** Adaptado de Bond *et al.*, (2016). .....53
- Figura 23: Biossíntese de hidrocarbonetos a partir de AGs de cadeia muito longa em insetos.** Os ácidos graxos são sintetizados pela ácido graxo sintase (FAS) e alongados pelas enzimas da via de alongamento. Posteriormente, são reduzidos pela ação de uma redutase e por fim, descarbonilados por uma enzima P450 (CYP4G nesse caso). Adaptado de Ginzel e Blomquist (2016). .....54
- Figura 24: Larvas de *T. castaneum* em estágio final de formação.** Ambas as larvas são oriundas de ovos silenciados. A: larva silenciada para o gene *Tc-chsA*

(gene quitina-sintase A) que afeta a formação da cutícula, mas não afeta a pigmentação dos ovos. B: larva silenciada para o gene *Tc-verm* que afeta a pigmentação dos ovos. A seta vermelha indica o olho da larva. O círculo branco indica a região em que deveria existir pigmentação ocular. Barra de escala = 100 µm. Retirado de Chaudhari *et al.*, (2015). .....60

**Figura 25: Esquema gráfico do ensaio com umidade controlada para avaliação de viabilidade após silenciamento gênico.** Ovos silenciados foram separados em dois grupos e mantidos em duas condições de umidade relativa: 5% e 75% UR. ....63

**Figura 26: Percentual de ovos intactos após três horas de exposição ao hipoclorito de sódio.** Ovos foram mantidos se desenvolvendo a 30 °C até serem expostos à digestão. Cada ponto representa a média e o erro padrão de três ou quatro experimentos independentes com um mínimo de 42 ovos por réplica.....70

**Figura 27: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-zen1* e *Tc-verm* com o kit T7 RiboMAX Express RNAi System através de eletroforese em gel de agarose.** M: marcador de peso molecular. ....71

**Figura 28: Viabilidade de ovos selvagens e pRNAi para *Tc-verm* e *Tc-zen1*.** Fêmeas selvagens ou injetadas com 0,2 µg de dsRNA foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas cada. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão de um experimento com 5 réplicas técnicas, obtidas entre 8 e 14 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui 96 ou 100 ovos cada, por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa, de acordo com *Two-way* ANOVA.....72

**Figura 29: Morfologia de ovos selvagens, pRNAi para *Tc-verm* e *Tc-zen1* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores e menores indicam células da serosa e do embrião, respectivamente. A, C, E e G: embriões no estágio inicial da gastrulação. B, D, F e H: embriões no estágio de extensão da banda germinal. A-D e G-H: todos os ovos apresentam aspecto normal. E-F: embriões com alterações no desenvolvimento características do silenciamento de *Tc-Zen1*: ausência de células da serosa e células do embrião mais difusas (E) e embrião com cabeça avantajada (F). A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,2 µg por fêmea. ..73

**Figura 30: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-zen1* e *Tc-verm* com o kit T7 RiboMAX Express RNAi System através de eletroforese em gel de agarose.** M: marcador de peso molecular. A caixa em vermelho indica a banca esperada para o controle.....74

**Figura 31: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-zen1* e *Tc-verm* com o kit Ambion® MEGAscript® RNAi através de eletroforese em gel de agarose.** M: marcador de peso molecular. Números pares e ímpares indicam a primeira e segunda eluição, respectivamente, oriundas da etapa final do protocolo de síntese. ....74

**Figura 32: Viabilidade de ovos selvagens e pRNAi para *Tc-verm* e *Tc-zen1*.** Fêmeas selvagens ou injetadas com 0,15 µg de dsRNA foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas cada. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em

estufas a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 3 réplicas técnicas, obtidas entre 9 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui 96 ovos, por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa, de acordo com *Two-way* ANOVA. ....75

**Figura 33: Morfologia de ovos selvagens, pRNAi para *Tc-verm* e *Tc-zen1* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores indicam núcleo da serosa e os menores, núcleos do embrião. A e C: embriões no estágio inicial da gastrulação. A, D e E: embriões no estágio de extensão da banda germinal. A-D: todos os ovos apresentam aspecto normal. E: ovo silenciado para *Tc-zen1* com fenótipo característico. A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,15 µg por fêmea. .76

**Figura 34: Frequência fenotípica para o silenciamento de *Tc-verm*.** Os fenótipos selvagem e forte significam, respectivamente, presença e ausência de cor nos olhos. O boxplot representa a mediana, o primeiro quartil, o terceiro quartil e os limites inferior e superior das frequências fenotípicas de um único experimento com 6 réplicas técnicas de 96 ovos cada, obtidas entre 9 e 15 dias após a injeção de dsRNA. ....76

**Figura 35: Viabilidade de ovos selvagens e pRNAi para *Tc-verm* e *Tc-zen1*.** Fêmeas injetadas com 0,15 µg de dsRNA foram mantidas em misturas de farinha de trigo, fluconazol e proprionato de cálcio a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 6 réplicas técnicas, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui 96 ovos, por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco representa  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way* ANOVA. ....77

**Figura 36: Morfologia de ovos pRNAi para *Tc-verm* e *Tc-zen1* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores indicam núcleos da serosa e os menores os do embrião. A-C: embriões no estágio inicial da gastrulação. B-D: embriões no estágio de extensão da banda germinal. A-B: Embriões com aspecto normal; C-D: Embriões com alterações no desenvolvimento. A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,15 µg por fêmea. ....78

**Figura 37: Frequência fenotípica para o silenciamento de *Tc-verm*.** Os fenótipos selvagem e forte significam, respectivamente, presença e ausência de cor nos olhos. O boxplot representa a mediana, o primeiro quartil, o terceiro quartil e os limites inferior e superior de um único experimento com 12 réplicas técnicas de 96 ovos cada, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. ....78

**Figura 38: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-elov1* através de eletroforese em gel de agarose.** M: marcador de peso molecular. Genes *elov1* indicados pela abreviação (e.g. *Tc-elov101* = E1) C: DNA controle. Números pares e ímpares indicam a primeira e segunda eluição, respectivamente, oriundas de etapa final do protocolo de síntese. ....79



**Figura 39: Efeito de diferentes quantidades de dsRNA no silenciamento quadruplo para os genes *Tc-elovl 01*, *Tc-elovl 02*, *Tc-elovl 03* e *Tc-elovl 04*.** Fêmeas injetadas com dsRNA foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposição diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufas a 35 °C em condição de 75 e 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 5 ou 6 réplicas técnicas, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de cada quantidade dsRNA. Cada réplica possui 96 ovos, por condição de UR. Cada letra representa a diferença significativa de acordo com *Two-way* ANOVA ( $P < 0,0001$ ). .....80

**Figura 40: Morfologia de ovos pRNAi para *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. A: embrião no estágio inicial de blastoderma indiferenciado. A': embrião no estágio de extensão da banda germinal. Ambos os embriões apresentam aspecto normal. ....80

**Figura 41: Duração do fenótipo do silenciamento conjunto para *Tc-elovl 01*, *Tc-elovl 02*, *Tc-elovl 03*, *Tc-elovl 04*.** Fêmeas injetadas com 0,05 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30 °C e 80% umidade relativa UR realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufas a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual de eclosão de um experimento com uma réplica técnica de 96 ovos, por condição de UR.....81

**Figura 42: Duração do fenótipo letal do silenciamento para *Tc-zen1*.** Fêmeas injetadas com 0,15 ou 0,05 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30° C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufas a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual de eclosão. Foi realizado apenas um experimento para cada quantidade de dsRNA injetada. Cada coluna representa uma réplica técnica de 96 ovos, por UR. Para cada experimento foi utilizados um total de 768 ovos, por condição de UR. ....82

**Figura 43: Duração da frequência fenotípica para o silenciamento de *Tc-verm*.** Fêmeas injetadas com 0,15 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30° C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. O fenótipo selvagem e forte significam, respectivamente, presença e ausência de cor nos olhos. É representado o percentual médio e o erro-padrão do fenótipo de um experimento com duas réplicas técnicas de 96 ovos por dia avaliado.....82

**Figura 44: Percentual da sobrevivência das larvas oriundas de ovos selvagens e silenciados para *Tc-elovl07*, *Tc-zen1* e o grupo de *Tc-elovl 01* a *04*.** Grupos de larvas recém-eclodidas foram mantidos a 35 °C em 75 ou 5% de umidade relativa (mesma condição experimental em que os ovos foram mantidos). Cada ponto representa o percentual médio e o erro padrão da sobrevivência das larvas de um único experimento com duas réplicas experimentais. Os ovos observados foram oriundos de coletas realizadas com 7 e 10 dias após a injeção de dsRNA. Foram avaliados por condição de UR um total de 401 larvas para selvagem; 338 larvas para

*Tc-elovl07*; 138 larvas para *Tc-zen1*; e 102 larvas para grupo de *Tc-elovl 01* a *04*. A linha pontilhada em vermelho indica o ponto de 50% de mortalidade das larvas. ....83

**Figura 45: Efeito dos silenciamentos individuais dos genes *elovl* na viabilidade dos ovos de *T. castaneum*.** Fêmeas injetadas com 0,03 µg de cada um dos dsRNAs foram mantidas em estufa a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão de dois a quatro experimentos independentes. Cada experimento consistiu de 1 a 6 réplicas técnicas de 24 a 96 ovos cada por condição de UR, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Foram avaliados, por condição de UR, um total de 816, 864, 848, 1184 e 864 ovos para *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03*, *Tc-elovl04* e *Tc-elovl07*, respectivamente. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco indica  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way* ANOVA. ....84

**Figura 46: Morfologia de ovos oriundos do silenciamento individual para *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03*, *Tc-elovl04* ou *Tc-elovl07* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores indicam os núcleos da serosa e menores, do embrião. Painéis superiores: embriões no estágio inicial da gastrulação. Painéis inferiores: embriões no estágio de extensão da banda germinal. Todos os embriões apresentam aspecto normal. ....85

**Figura 47: Efeito de diferentes quantidades de dsRNA para *Tc-elovl04* na viabilidade dos ovos de *T. castaneum*.** As quantidades de dsRNA injetadas estão indicadas abaixo das colunas. Fêmeas injetadas foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão de 1 a 4 experimentos independentes. Cada experimento consistiu de 1 a 6 réplicas técnicas de 24 a 96 ovos cada por condição de UR, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Foi avaliado por condição de UR um total de 288, 576 e 1184 ovos para as quantidades de 0,1, 0,05 e 0,03 µg de dsRNA, respectivamente. As letras representam diferenças significativas (*Two-way* ANOVA,  $P < 0,0001$ ). ....86

**Figura 48: Efeito do silenciamento triplo para *Tc-elovl01*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* e silenciamento duplo para *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* na viabilidade dos ovos de *T. castaneum*.** A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,03 µg por fêmea. Fêmeas injetadas com 0,03 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35°C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 2 a 5 réplicas técnicas, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui de 59 a 96 ovos por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco representa a diferença significativa com  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way* ANOVA. ....87

- Figura 49: Expressão gênica das 18 *Tc-elovls* em ovos.** Foi realizada RT-PCR com cDNAs obtidos de ovos selvagens e silenciados para *Tc-elovl04* com 0-6 HAO e 8-18 HAO. Algarismos romanos indicam as três réplicas biológicas independentes. Controle positivo: PCR com DNA genômico (g). Controle negativo: PCR sem DNA (N, de *non template control*) Todos os genes amplificaram no tamanho de banda esperado de acordo com a Tabela 4 .....90
- Figura 50: Expressão relativa dos genes *Tc-elovl* por PCR em tempo real em grupos de ovos selvagens com 0-6 e 8-18 HAO.** Os dados foram normalizados pelo grupo de 0-6 HAO. As barras representam a média e o erro padrão de três experimentos distintos. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco: diferença significativa, ambos de acordo com *Two-way* ANOVA ( $P < 0,0001$ ). .....91
- Figura 51: Expressão relativa dos genes *Tc-elovl* por RT-qPCR em ovos controle e silenciados para *Tc-elovl04*.** O cDNA controle é oriundo de ovos selvagens. Dois padrões temporais foram analisados: 0-6 horas após a oviposição (HAO) e 8-18 HAO. As barras representam a média e o erro padrão de três experimentos distintos. O asterisco representa a diferença significativa de acordo com *Two-way* ANOVA.  $P < 0,0001$ . .....92
- Figura 52: Predição de hélices transmembranas da proteína Tc-ELOVL04.** O eixo horizontal indica a numeração de resíduos de aminoácidos da proteína. O eixo vertical indica a probabilidade de ocorrência de hélices transmembrana e de regiões hidrofílicas. As porções em vermelho representam as prováveis regiões transmembranares da proteína. Porções em azul e rosa representam respectivamente as prováveis regiões hidrofílicas, da parte interna e externa da proteína. ....93
- Figura 53: Árvore filogenética de elongases de levedura, insetos e humano.** A árvore foi construída com as sete sequências de *Homo sapiens* ELOVL1 a 7 (quadrados rosa); com as três sequências da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 a 3; as 20 sequências da mosca *D. melanogaster*, as 18 sequências de *T. castaneum* e duas das elongases do besouro *Tenebrio molitor* (círculos em vermelho). As quatro elovl estudadas nesta tese estão identificadas na imagem, à direita. Os triângulos em azul identificam as sequências já estudadas em *D. melanogaster*. A caixa em azul identifica as elongases dos seres multicelulares que se agrupam junto as três elongases de levedura. Caixa em verde identifica as elongases de insetos que se agrupam com as ELOVL2, 4 e 5 de humanos. Em vermelho as sequências que agrupam junto à ELOVL1 e 7 de *H. sapiens*. Caixa em preto identifica elongases exclusivas de insetos. Adaptado de Zheng *et al.* (2017). ..... 101
- Figura 54: Árvore filogenética de *T. castaneum* e *N. lugens*.** A árvore foi construída com as 18 sequências de *T. castaneum* (Tc-ELOVL01 a 18); e com as quatro sequências importantes para a impermeabilização cuticular de ninfas de *N. lugens* (Ni-ELO2, 3, 8 e 16). Os círculos em marrom indicam as sequências de elongase que foram silenciadas na presente tese. .... 102

## CAPÍTULO II:

**Figure 1: Dynamics of blastodermal cuticle formation and chorion rupture during early springtail embryogenesis.** Schemes of egg cross-section. Increase in egg size is due to water uptake. (A) Early egg with cells at the uniform blastoderm stage. (B) Blastoderm cells differentiate into embryonic and extraembryonic ones. (C) The differentiated blastoderm produces a blastodermal cuticle that is initially wrinkled. (D) Extraembryonic cells move inward the egg while the increase in egg volume leads to chorion rupture. (E) Chorion remnants become the polar caps and embryogenesis proceeds within the expanded blastodermal cuticle that is now the sole egg cover. At this stage, egg permeability to water is unknown. For the sake of simplicity, yolk cells are not shown. Depending on the species, the blastodermal cuticle is secreted before or after blastoderm differentiation, is smooth or with ornaments, is one or more cuticles. The degree of egg size increase varies among species, as well as the embryonic stage where chorion rupture occurs. Based on Marshall and Kevan 1962, Bretfeld 1963, Jura 1967, 1972, Uemiya and Ando 1987, Tomizuka and Machida 2015, Rezende *et al.* 2016. .... 109

**Figure 2: Egg laying behavior and total period of embryogenesis differs between species.** (A) Eggs of *O. cincta* (red arrows) are laid singly or in pairs. Chorion rupture already occurred in these eggs. White arrow: posterior part of an adult body. (B) Eggs of *F. candida* are laid in a cluster. Insets show magnified eggs. As described in the Introduction, *O. cincta* eggs are larger than *F. candida* ones. (C, D) Cumulative juvenile hatching is depicted for eggs developed at 20 °C and 70% RH. Embryogenesis occurs faster in *O. cincta* (C) than in *F. candida* (D). Each geometric shape represents an independent assay and each point represent mean and standard error, normalized by total hatching. A total of 225 and 315 eggs of *O. cincta* and *F. candida* were evaluated, respectively. .... 115

**Figure 3: Chorion ruptures and blastodermal cuticle is exposed within the first third of embryogenesis.** For both species eggs developed at 20 °C. (A) Chorion rupture of *O. cincta* and *F. candida* eggs were recorded. Each geometric shape represents an independent assay and each point represent mean and standard error, normalized by total eggs employed per assay. A total of 140 and 315 eggs of *O. cincta* and *F. candida* were evaluated, respectively. (B) Egg aspect before and after chorion rupture. Pseudocolour in right-most panels indicate the polar caps (in grey) and the exposed blastodermal cuticles (in pink). .... 116

**Figure 4: Egg permeability changes during embryogenesis at 20 °C.** (A, B) Eggs of *O. cincta* were air-dried for 15 minutes or two hours, at different embryonic ages. (C, D) Eggs of *F. candida* were air-dried for five or 15 minutes, at different embryonic ages. The percentage of intact eggs (i.e. that did not shrink) was recorded. A total of 890 and 1435 eggs of *O. cincta* and *F. candida*, respectively, were evaluated. Grey bars indicate the period of chorion rupture. Right-most panels indicates the aspect of intact and shrunken eggs. .... 117

**Figure 5: Formation of the blastodermal cuticle bestow protection against water loss.** Eggs developing in moist at 20 °C were transferred to dry filter paper in the moments indicated in the x-axis. For each time point, eggs were left drying for 15 minutes or 2 hours, when they were returned to moist until embryogenesis completion, when hatching rates were recorded. Data are expressed as percent

viability, normalized from control samples, kept under moist conditions throughout development..... 118

**Supplementary Figure 1: Arthropod phylogeny with estimates on time of divergence and number of species.** The divergence periods indicated are the median time estimated at timetree.org (accessed on 27/03/2019). Values alongside each terminal taxon indicates the percentage of species regarding the total number of living animal species, estimated as 1,527,660 (Zhang 2011). ..... 124

**Supplementary Figure 2: Background information for *Orchesella cincta***..... 125

**Supplementary Figure 3: Some rearing conditions for *Foslomia candida***..... 125

**Supplementary Figure 4: Scheme of *O. cincta* and *F. candida* egg laying.** (A) *O. cincta* adults were sexed and transferred to small jars containing a piece of bark. Jars were carefully observed to check the presence of the first eggs. Adults were then transferred to a new jar where egg laying lasted for 8 or 12 hours, when adults were removed. (B) Parthenogenic *F. candida* females were transferred for small jars, where egg laying lasted for 8 hours, when females were removed. .... 126

**Supplementary Figure 5: Methodology for the egg viability assay.** The procedure was the same for *O. cincta* and *F. candida*. (A) Eggs are developing on wet plaster until the desired stage is reached. (B) Eggs were then left air-drying for two different periods: 15 minutes or 2 hours. (C) After these periods were completed, eggs were returned to wet plaster until the completion of embryogenesis, when hatching rates were scored. Controls were left on wet plaster throughout the whole embryogenesis (not shown). ..... 126

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I:

<b>Tabela 1: Sequências <i>Tc-eloV1</i> encontradas no genoma de <i>T. castaneum</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 2: Lista dos primers para <i>Tc-eloV1</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 3: Lista dos <i>primers</i> usados no RT-qPCR.....</b>	<b>69</b>
<b>Tabela 4: Tamanho esperados dos amplicons, após RT-PCR .....</b>	<b>90</b>

### CAPÍTULO II:

<b>Table 1: Parameters related to springtail embryonic development at 20 °C ....</b>	<b>115</b>
<b>Table 2: Comparative periods of springtail embryogenesis at different constant temperatures reported in the literature .....</b>	<b>120</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- µg – Micrograma  
µL – Microlitro  
µm – Micrometro  
AG – Ácido graxo  
AGs – Ácidos graxos  
Cam – Cambriano  
Car – Carbonífero  
*chs1* – Gene quitina sintase 1  
D – Devoniano  
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do Inglês, *deoxyribonucleic acid*)  
dsRNA – Dupla fita de RNA  
*e.g.* – Por exemplo (do Latim, *exempli grata*)  
ELOVL – Enzima elongase  
*elovl* – Gene elongase  
FAS – ácido graxo sintase (do Inglês, *fatty acid synthase*)  
GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do Inglês, *Gas chromatography–mass spectrometry*)  
g – Grama  
HC – hidrocarboneto  
HCs – Hidrocarbonetos  
HAO – Horas após a oviposição  
*i.e.* – Isto é (do Latim, *id est*)  
J – Jurássico  
K – Cretáceo  
MAA – Milhões de anos atrás  
mL – Mililitro  
N – Eoceno  
ng – Nanograma  
O – Ordoviciano  
Pal – Paleoceno  
PBS – Tampão fosfato-salino (do Inglês, *Phosphate-buffered saline*)

PBST – Tampão fosfato-salino com 0,05 % de Tween-20 do Inglês, *Phosphate-buffered saline supplemented with Tween 20*

Per – Permiano

pRNAi – RNA de interferência parental

RNA – Ácido ribonucleico (do Inglês, *ribonucleic acid*)

RNAi – RNA de interferência (do Inglês, *RNA-mediated interference*)

S – Siluriano

Tr – Triássico

UR – Umidade relativa

*verm* – Gene *vermillion*

*zen1* – Fator de transcrição *zerknüllt1*



## RESUMO

A vida se originou no meio aquático e a terrestreização foi um dos eventos mais importantes da história da vida na Terra. Entre os animais, Hexapoda (Collembola, Protura, Diplura e Insecta) teve maior sucesso na conquista da terra, com destaque para Insecta. O exoesqueleto impermeabilizado, o sistema respiratório internalizado e o sistema excretor que minimiza a perda de água foram características importantes para a existência do grupo na terra. Contudo, a formação de camadas protetoras dos ovos também foi importante para o sucesso do grupo. Os ovos de Hexapoda apresentam uma casca que tem como função protegê-los da ação de predadores e também de alterações de fatores abióticos, como a variação de umidade. A casca dos ovos é composta por camadas de origem materna e uma cutícula (serosa ou blastodermal) produzida no início da embriogênese. Em insetos, a cutícula serosa é secretada pelas células da serosa, um tecido extraembrionário. Essa cutícula desempenha papel importante para a proteção dos ovos contra a perda de água, contém quitina em sua estrutura e evidências genéticas sugerem a presença de lipídeos na mesma. Collembola possui uma cutícula blastodermal que é sintetizada pelas células do blastoderma. Na literatura, não há informação sobre a função desta estrutura para os ovos de Collembola. Este trabalho, dividido em dois capítulos, se propôs a compreender fatores importantes para a proteção dos ovos contra a perda de água. O primeiro capítulo, com Coleoptera *Tribolium castaneum*, focou o papel de quatro genes da família elongase (*Tc-elovl*) na impermeabilização dos ovos e sua presença na cutícula serosa. O RNAi parental desses genes foi usado e apenas o silenciamento para *Tc-elovl04* diminuiu a viabilidade dos ovos sob condição de baixa umidade relativa. O segundo capítulo investigou a formação da cutícula blastodermal e seu papel na proteção contra a perda de água durante a embriogênese de *Orchesella cincta* e *Folsomia candida* (Collembola). Em ambas as espécies, antes da formação da cutícula blastodermal, os ovos murcham e morrem depois de 15 minutos em ambiente seco, mas depois da formação dessa cutícula, os ovos sobrevivem na mesma condição. Ovos de *O. cincta* resistem mais à dessecação do que os de *F. candida*. Os resultados aqui apresentados mostram que o gene *Tc-elovl04* é importante para a proteção dos ovos de *T. castaneum* e que a cutícula blastodermal de colêmbolos tem papel na proteção contra a perda de água dos ovos. A presença de uma cutícula extraembrionária que protege o ovo contra a perda de água, é uma característica conservada em Hexapoda, sendo um traço ancestral que provavelmente facilitou a colonização do ambiente terrestre por esse grupo.

**Palavras-chave:** Elongases, cutícula serosa, cutícula blastodermal, Hexapoda, terrestreização

## ABSTRACT

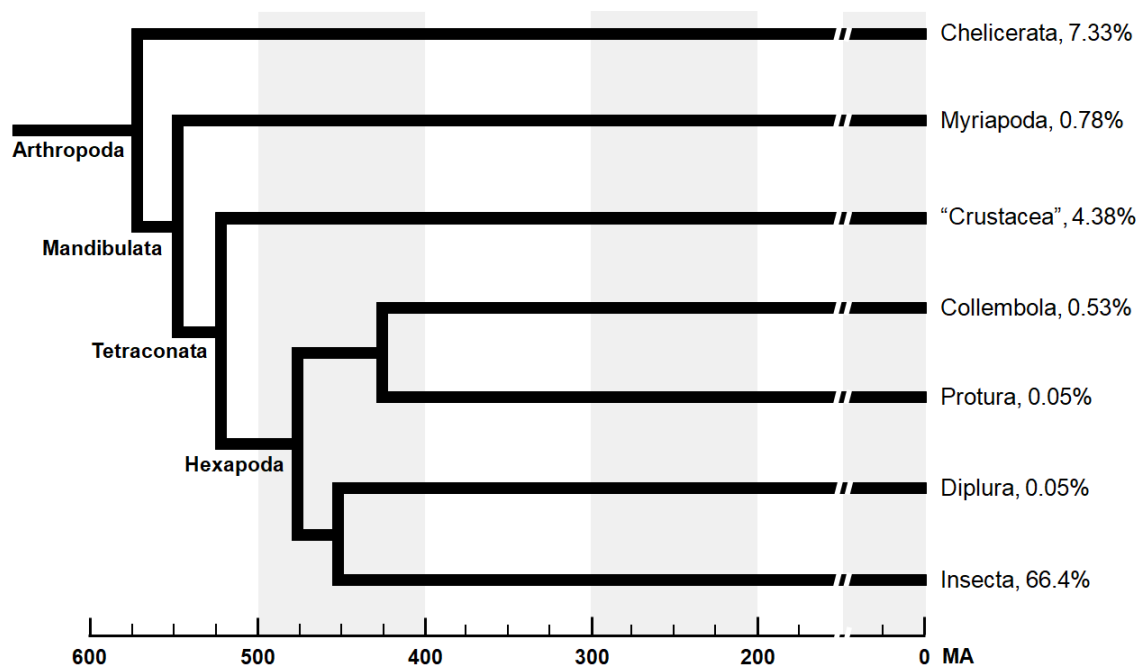
Life originated on water and terrestrialization was one of the most important events in the history of life on Earth. Among animals, the hexapods (Collembola, Protura, Diplura and Insecta) had the greatest success in the conquest of the land, specially insects. The waterproof exoskeleton, the internalized respiratory system and the excretory system, all that minimize water loss, were important traits for the existence of this group on land. However, the formation of protective eggshell layers was also important for the success of hexapods. Hexapoda eggs have a shell whose function is to protect eggs from the predators and changes in abiotic factors such as humidity variances. The eggshell is composed of layers of maternal origin and a cuticle (serosal or blastodermal) produced during early embryogenesis. In insects the second structure, called serosal cuticle, is secreted by the serosa cells, an extraembryonic tissue. This cuticle plays an important role protecting eggs against water loss, contains chitin in its structure and genetic evidences suggests the presence of lipids on it. Unlike insects, collembolans have a blastodermal cuticle that is synthesized by blastodermal cells at an even earlier stage of embryogenesis. There is no information about the function of this structure for collembolans eggs. This work, divided in two chapters, aims to understand important factors for the protection of eggs against water loss. The first chapter, with the Coleoptera *Tribolium castaneum*, focused on the role of four elongase genes (*Tc-elov1*) in the waterproofing of eggs and their presence in the serosa cuticle. Parental RNAi was used to show the importance of these genes and silencing only for *Tc-elov104* decreased egg viability the under a condition of low relative humidity. The second chapter investigated the formation of blastodermal cuticle and its role in protecting against water loss during the embryogenesis of the species *Orchesella cincta* and *Folsomia candida* (Collembola). In both species, before blastodermal cuticle formation, eggs wither and die after 15 minutes in a dry environment, but after the formation of this cuticle the eggs survive in the same condition. *Orchesella cincta* eggs are more resistant to desiccation than *F. candida* ones. Here we showed that the *Tc-elov104* gene is important for the protection of *T. castaneum* eggs and that the blastodermal cuticle of springtails plays a role in protecting against the water loss from eggs. The formation of post-zygotic cuticle in the eggs is conserved during the evolution of Hexapoda, being an ancestral trait that, most likely, facilitated land colonization by this group.

**Keywords:** Elongases, serosal cuticle, blastodermal cuticle, Hexapoda, terrestrialization

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. Filo Arthropoda

O Filo Arthropoda é constituído pelos subfilos Chelicerata (que inclui aranhas e escorpiões, dentre outros), Miriapoda (e.g. lacraias e piolhos-de-cobra), Crustacea (e.g. cracas, caranguejos e siris), Hexapoda (e.g. insetos). Este grupo apresenta mais de 1,2 milhões de espécies descritas (Zhang, 2011), constituindo cerca de 80% do total de espécies animais conhecidas. Só a superclasse Insecta corresponde 66% do total de espécies de animais conhecidas (Figura 1). É um grupo monofilético que apresenta como principais características comuns: tagmose, que é a segmentação corporal com regiões especializadas (e.g. a presença de um tórax com apêndices locomotores e um abdômen ausente de apêndices, como ocorre em insetos), um exoesqueleto enrijecido com diversos escleritos, um sistema circulatório aberto, olhos compostos bem estruturados e um crescimento associado à ecdise (Brusca e Brusca, 2003; Grimaldi e Engel, 2005).



**Figura 1: Relação filogenética do Filo Arthropoda com a estimativa do tempo de divergência entre os grupos e o percentual do número de espécies.** Os períodos de divergência são baseados em estimativas de medianas de vários estudos feitas pelo sítio timetree.org, acessado em 27/03/2019. Os valores na porção à direita indicam percentagem de espécies em relação ao número total de espécies de animais vivos, estimado por Zhang (2011), que é de 1.527.600. Collembola, Protura e Diplura constituem o taxon "Entognatha". "Crustacea" e "Entognatha" são grupos parafiléticos (Misof *et al.*, 2014) MA: milhões de anos. Imagem gentilmente cedida por Gustavo Rezende.

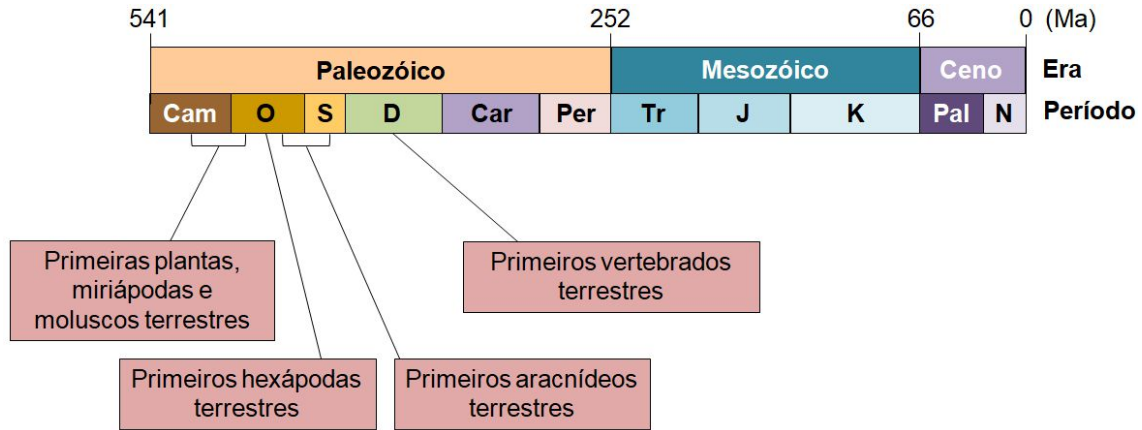
O Filo Arthropoda é um dos grupos de maior diversidade morfológica (Figura 2) (Grimaldi e Engel, 2005) e que possui grande relevância ecológica, a exemplo de espécies de insetos que atuam como polinizadores (desde abelhas, borboletas, moscas até besouros) (Grimaldi e Engel, 2005), espécies de miriápodes que atuam na decomposição da serrapilheira (Crawford, 1992) e espécies de cupins que são ativos na degradação da celulose (Higashi *et al.*, 1992). Apresentam relevância econômica e de saúde pública, visto inúmeros espécies de insetos e carrapatos que são pragas na agropecuária ou ainda vetores na transmissão de patógenos nocivos ao ser humano e a outros animais. Também se destacam no campo científico, como o clássico exemplo do uso da espécie *Drosophila melanogaster* como modelo de estudo para a área genética, dentre outras (Grimaldi e Engel, 2005; Klowden, 2013). Outro fator que faz o filo Arthropoda possuir considerável interesse dentro do campo científico é o grande sucesso do grupo no processo de terrestrialização.



**Figura 2: A diversidade morfológica do Filo Arthropoda.** A: *Pycnogonum rickettsi* (Schmitt 1934) (Chelicerata). B: *Danaus plexippus* (Linnaeus 1758) (Hexapoda). C: *Scolopendra gigantea* (Linnaeus 1758) (Miriapoda). D: *Limulus polyphemus* (Linnaeus 1758) (Chelicerata). E: *Damen* sp. (Koch 1850) (Chelicerata). F: *Danielopolina* sp. (Kornicker and Sohn 1976) (Crustacea). G: *Calliphora vomitoria* (Linnaeus 1758) (Hexapoda). H: *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896) (Crustacea). I: *Vespula vulgaris* (Linnaeus 1758) (Hexapoda). J: *Triops cancriformis* (Bosch 1801) (Crustacea). K: *Pollicipes polymerus* (Sowerby 1883) (Crustacea). L: *Odontodactylus scyllarus* (Linnaeus 1758) (Crustacea). M: um representante da classe Symphyla (Miriapoda). Retirado de Legg (2013).

A terrestreização é considerada o terceiro evento mais importante da história da vida na Terra, depois da origem da vida em ambiente aquático e o surgimento dos organismos multicelulares (Selden, 2016). Durante a Era Paleozóica, o ambiente terrestre foi colonizado por seres multicelulares: plantas, moluscos, vertebrados (tetrápodes) e artrópodes (Figura 3). As primeiras plantas e moluscos terrestres emergiram entre a metade do período Cambriano e o início do Ordoviciano a aproximadamente 515 a 470 milhões de anos atrás (MAA) (Little, 1983; Morris *et al.*, 2018). Dentro do filo Arthropoda, o processo de terrestreização ocorreu de maneira independente por no mínimo sete vezes, dentre os diferentes grupos. Os primeiros a dominarem o continente foram os miriápodes que colonizaram a terra durante o Cambriano, no mesmo período que plantas e moluscos. Em seguida os hexápodes colonizaram a terra durante o Ordoviciano e depois os aracnídeos, entre o Ordoviciano e o Siluriano. Além desses grupos, podemos destacar os

processos realizados por Malacostraca (isópodes, ostracodas, anfípodes e decápodes). Os primeiros vertebrados só começaram a desbravar o continente a partir do período Devoniano (aproximadamente 419 MAA) (Little, 1983; Lozano-Fernandez *et al.*, 2016; Rota-Stabelli *et al.*, 2013).



**Figura 3: Eras e períodos geológicos e surgimento dos primeiros seres terrestres multicelulares.** Eras do Paleozóico, Mesozóico e Cenozóico (Ceno) indicam o período de tempo compreendido entre 541 milhões de anos (MAA) atrás e o tempo atual. Essas eras são divididas nos seguintes períodos (descritos em ordem cronológica): Cambriano (Cam), Ordoviciano (O), Siluriano (S), Devoniano (D), Carbonífero (Car), Permiano (Per), Triássico (Tr), Jurássico (J), Cretáceo (K), Paleoceno (Pal) e Eoceno (N). Baseado em Rota-Stabelli *et al.* (2013) e Knoll e Nowak (2017).

O processo de terrestrialização realizado pelo grupo dos vertebrados é o melhor compreendido e estudado dentro da literatura. Já no caso dos artrópodes, poucos são os estudos dentro do tema (Little, 1983). Neste trabalho, focaremos nos fatores que ajudaram os hexápodes na conquista do ambiente terrestre e, mais especificamente, as características existentes nos ovos.

## 1.2. Subfilo Hexapoda e as características que permitiram a permanência do grupo no ambiente terrestre

Hexapoda é um grupo de grande sucesso evolutivo que apresenta um enorme número de espécies; cerca de dois terço de todos os animais descritos pertencem a este subfilo (Zhang, 2011). É formado pelo grupo parafilético Entognatha (Collembola, Protura e Diplura) e Insecta, monofilético (Figura 1) (Giribet e Edgecombe, 2012; Misof *et al.*, 2014; Regier *et al.*, 2010).

O processo de terrestrialização realizado dentro do grupo dos insetos culminou numa grande diversidade vide a variedade de espécies descritas. Contudo, o evento de terrestrialização permanece ainda pouco explorado e

com grandes lacunas de entendimento. Uma das grandes questões muito discutida na literatura é sobre a rota utilizada para a conquista do ambiente terrestre, se marinha ou de água doce. Alguns autores tentam compreender tal processo através das relações filogenéticas de Hexapoda com seu "grupo irmão" "Crustacea". Atualmente, a hipótese melhor aceita é de que Hexapoda é grupo irmão de Xenocarida (Crustacea) o que fortalece e suporta a ideia de que os primeiros hexápodes terrestres adentraram a terra a partir da rota marinha (Giribet e Edgecombe, 2012; Regier *et al.*, 2010; Rota-Stabelli *et al.*, 2013).

Assim como qualquer outro organismo, os hexápodes foram capazes de adentrar e permanecer no meio terrestre por apresentarem características que o fizeram capazes de vencer as variações físicas entre os ambientes. Por exemplo, a densidade da água no ambiente marinho é de 1,025 g/mL (a 20 °C e 76 cmHg) o que a torna 1000 vezes mais densa do que o ar e garante a qualquer organismo que ali habite um grande suporte corporal. Contudo, a locomoção no ambiente aquático é dificultada devido à grande viscosidade do sistema, quando comparado com o ar (Dunlop *et al.*, 2013; Little, 1983).

Outra característica relevante é a importância da água, por ser uma molécula essencial para a manutenção de qualquer forma de vida. Atua como solvente para diversos solutos e ainda como meio no quais muitas reações bioquímicas ocorrem. Além disso, é fundamental para a manutenção da homeostase dos seres vivos, mantendo a distribuição de calor e as taxas de temperatura (Edney, 1977).

Independente do sistema, aquático ou terrestre, os organismos encontram dificuldades em obter água para os seus processos fisiológicos e para mantê-la em seus corpos. No meio aquático, apesar de estarem imersos em água, a dificuldade de captação e manutenção se dá devido à diferença de pressão osmótica entre o meio e o corpo do organismo. Já no meio terrestre, isso se dá principalmente devido à baixa disponibilidade de água no ambiente, posto que a mesma está presente apenas como vapor no ar, o que é, na prática, mensurado como percentual de umidade relativa. Assim, organismos terrestres são bastante vulneráveis as variabilidades do ambiente, como a mudança de temperatura e de umidade relativa, por exemplo. Tanto um

aumento de temperatura quanto uma queda de umidade relativa tornam seres terrestres mais susceptíveis a perda de água (Little, 1983).

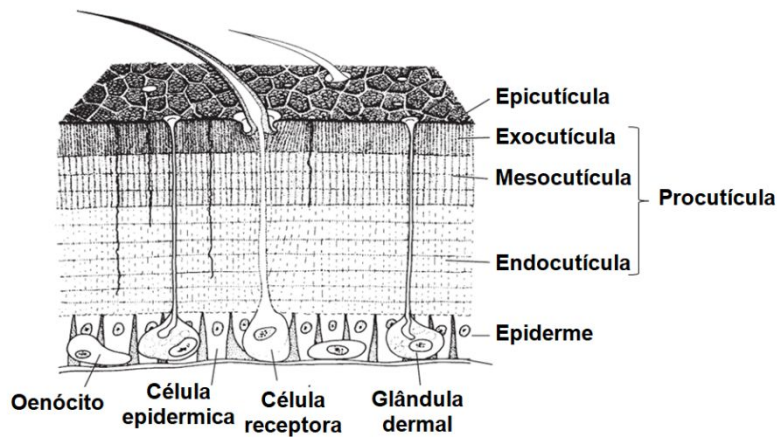
Um hexápode, em qualquer estágio de vida fora do ovo, é passível de perder água através do tegumento e através de atividades fisiológicas essenciais como a respiração e a excreção (Brusca e Brusca, 2003; Chapman *et al.*, 2013; Klowden, 2013). Algumas características presentes nos hexápodes foram capazes de contornar esses desafios e serão descritos a seguir.

### **1.2.1. A presença de um exoesqueleto rico em lipídeos**

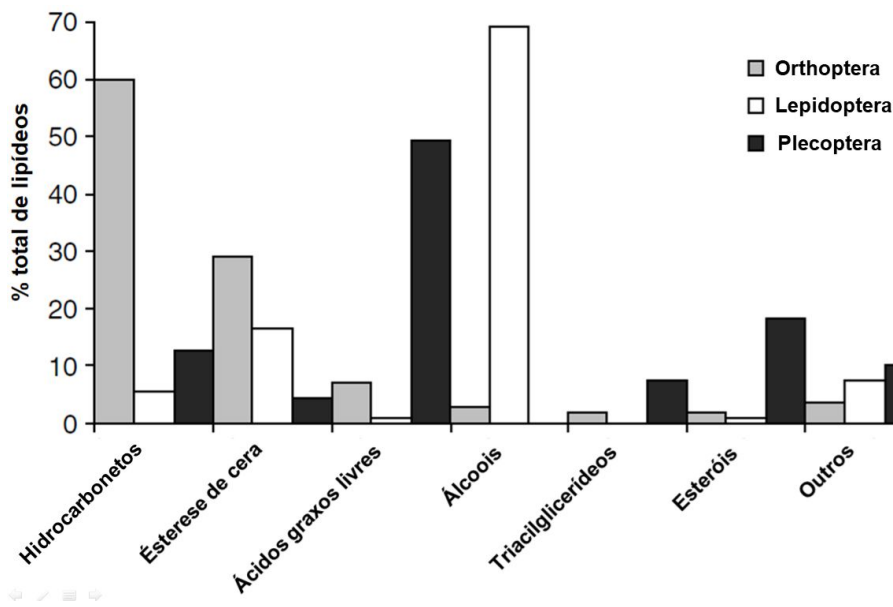
Como já relatado, os hexápodos apresentam como estrutura corporal um tegumento composto pelas células da epiderme e um exoesqueleto (Figura 4). O exoesqueleto não só foi importante para garantir uma maior sustentação corporal dos organismos fora da água como também apresenta compostos que contribuem para a proteção contra a perda de água (Klowden, 2013).

Basicamente, o exoesqueleto é composto por um complexo de camadas cuticulares que são secretadas pela epiderme (Figura 4). A porção mais interna é a pró-cutícula, subdividida em endocutícula, mesocutícula e a exocutícula. É uma região rica em proteína e quitina e esta é a porção do exoesqueleto que garante a rigidez através de esclerotização, quando necessário. A porção mais externa do exoesqueleto é denominada epicutícula, camada rica em lipídeos, sendo os mais predominantes os hidrocarbonetos, ésteres de ceras, álcoois e ácidos graxos livres (Figura 5). Esses compostos, todos hidrofóbicos, auxiliam na impermeabilização e minimizam a perda de água (Chapman *et al.*, 2013; Klowden, 2013).





**Figura 4: Esquema generalizado do tegumento de Hexapoda.** O tegumento é composto de uma monocamada epidérmica, seguido de uma matriz extracelular complexa, formada por uma procutícula mais interna e uma epicutícula, mais externa. A pró-cutícula é dividida em: endocutícula, camada mais interna rica em quitina e proteínas; mesocutícula, região com proteínas sem a presença de quitina; e exocutícula, porção mais externa que confere a rigidez do sistema. A epicutícula é rica em proteínas e lipídeos que garantem a impermeabilização. Adaptado de Klowden (2013).



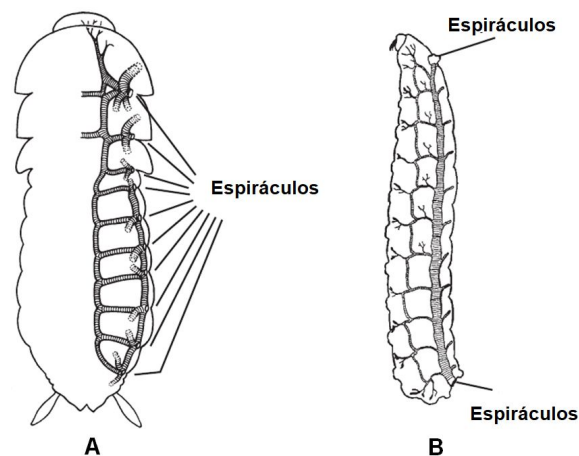
**Figura 5: Principais grupos de lipídeos que ocorrem na epicutícula de alguns insetos.** As diferentes espécies químicas são mostradas como porcentagem de lipídeo total em diferentes espécies de insetos. Em gafanhotos, predominam hidrocarbonetos, em lagartas, álcoois e em Plecoptera adulto, ácidos graxos livres. Adaptado de Chapman *et al.* (2013).

### 1.2.2. Sistema respiratório internalizado

As espécies aquáticas que deram origem aos artrópodes terrestres apresentavam um sistema respiratório branquial externo. Esta arquitetura seria impraticável em meio terrestre, uma vez que depende fortemente da presença de água para uma troca gasosa eficiente. Dentro destes precedentes, os

organismos terrestres desenvolveram sistemas respiratórios internalizados. Aracnida apresenta *book lungs* ou pulmões em forma de livro, porções lameladas contidas dentro de bolsa, através das quais os gases se difundem entre a hemolinfa e o ar (Brusca e Brusca, 2003; Dunlop *et al.*, 2013).

Hexapoda e Miriapoda possuem um sistema extremamente eficiente, o sistema respiratório traqueal. Este sistema possibilita uma troca direta de gases entre o ar e a hemolinfa e entre o ar e os órgãos. Os túbulos ramificados se abrem externamente através de orifícios externos no corpo, nas regiões do tórax e do abdômen, chamados de espiráculos (Figura 6). Em algumas espécies como, *Blatella germanica*, os espiráculos são do tipo holopneustico, todos abertos e funcionais (Figura 6A). Em outras, como em larvas da família Cyclorrhapha, os espiráculos são do tipo hemipneustico, apresentando apenas dois espiráculos funcionais (Figura 6B) (Chapman *et al.*, 2013). Em muitas espécies terrestres, os espiráculos apresentam um mecanismo de fechamento que possibilita o controle da troca gasosa, da pressão interna e da perda de água em situações de estresse hídrico (Chapman *et al.*, 2013; Dunlop *et al.*, 2013).



**Figura 6: Tipos de espiráculos em insetos.** A: Arranjo de espiráculos distribuídos pelo corpo do animal. B: Arranjo com dois espiráculos funcionais. As ramificações do sistema traqueal (túbulos com calibre menor que o tronco principal que é ligado diretamente aos espiráculos) garantem a troca gasosa em todas as regiões do corpo. Adaptado de Klowden (2013).

### 1.2.3. Sistema de excreção

A catabolização de proteínas oriundas da alimentação acarreta na formação de amônia ( $\text{NH}_3$ ), um composto altamente tóxico que precisa ser eliminado de forma rápida e eficiente. Animais aquáticos têm a facilidade de

eliminar amônia diretamente sem sofrer com déficit hídrico. Contudo, hexápodes (assim como outros artrópodes terrestres) eliminam a amônia transformando-a em ácido úrico, um composto que é excretado de forma sólida e sem demandar água. As excretas são produzidas pelos túbulos de Malpighi, derivados da porção final do intestino. Estas estruturas tem papel importante na reabsorção de íons e água em espécimes terrestres (Chapman *et al.*, 2013; Dunlop *et al.*, 2013).

#### **1.2.4. Cascas dos ovos de Hexapoda**

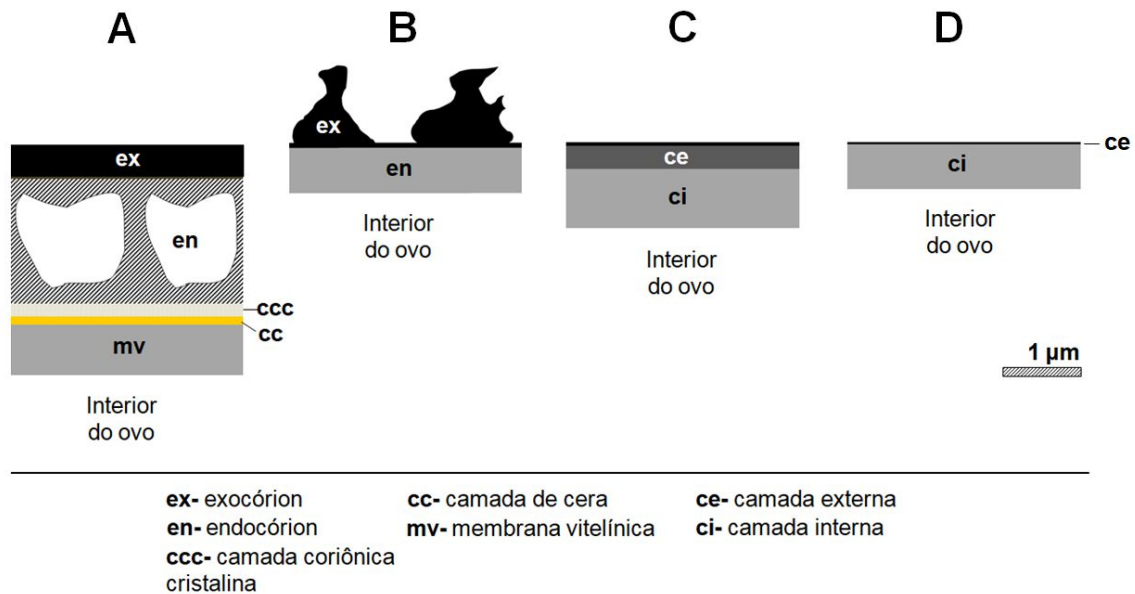
Além das características descritas acima, outro fator essencial para o sucesso de Hexapoda no ambiente terrestre foi a presença de uma casca do ovo que conseguisse proteger de forma eficiente o embrião em desenvolvimento contra as intempéries ambientais (Dunlop *et al.*, 2013; Zeh *et al.*, 1989). A casca dos ovos é uma estrutura complexa composta por multicamadas ricas em proteína e que apresentam duas origens distintas: camadas de origem materna, que são secretadas durante o estágio final da ovogênese pelas células epiteliais do folículo ovariano; e camadas de origem pós-zigótica que são sintetizadas durante a embriogênese inicial (Rezende *et al.*, 2016; Woods *et al.*, 2005).

A principal função da casca dos ovos é permitir o fluxo de gases e também evitar que os embriões sejam alvo de predação, da ação de microrganismos patogênicos e das variações abióticas como o estresse hídrico (Klowden, 2013; Rezende *et al.*, 2016). Apesar de sua relevância, poucos autores dão destaque a este tópico ao abordarem o tema terrestrialização (Jacobs *et al.*, 2013; Zeh *et al.*, 1989). O processo de formação da casca dos ovos é bem descrito para diversas espécies. Aqui, iremos focar esse processo em insetos e colêmbolos, alvos de estudo desta tese.

#### **1.3. A estrutura da casca dos ovos de origem materna**

No caso dos insetos a porção da casca de origem materna pode apresentar uma organização complexa como em *Drosophila melanogaster* que apresenta exocócion, endocócion, camada coriônica cristalina, camada de cera e membrana vitelínica (Figura 7A) (Rezende *et al.*, 2016); ou pode ser mais simples, como a descrita para mosquitos *Anopheles albiparvus*, com a presença de um exocócion e um endocócion (Figura 7B) (Monnerat *et al.*, 1999). Padrão

similar é observado em Collembola, algumas espécies como *Hypogastrura succinea* apresentam duas camadas de casca, uma mais externa com características de alta eletrondensidade e uma camada mais interna (Figura 7C). Já ovos da espécie *Heteromurus nitidus* apresentam uma camada externa muito fina, seguida de uma espessa camada interna (Figura 7D) (Larink e Biliński, 1989). Além disso, nas espécies descritas acima a espessura das camadas da casca de origem materna varia entre 0,6 e 3  $\mu\text{m}$ .



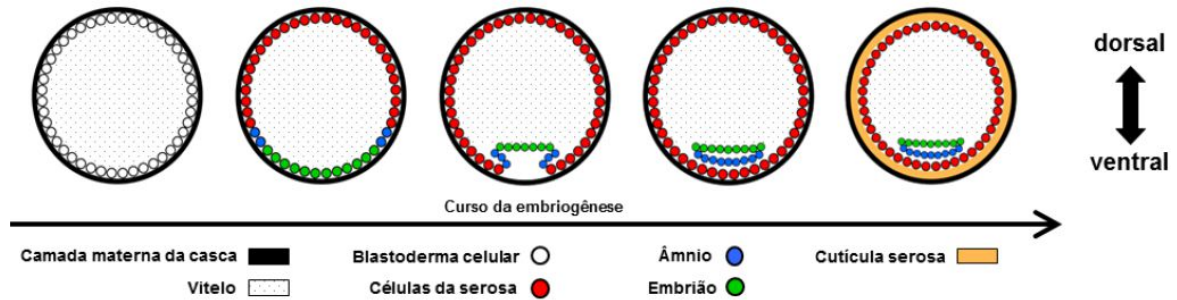
**Figura 7: Esquema das camadas da casca de origem materna de ovos de Hexapoda.** A: *Drosophila melanogaster* e B: *An. albitarsis*, dois exemplos em insetos, com espessura de casca de 3 e 1,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente. C: *H. succinea* e D: *H. nitidus*, dois exemplos em colêmbolos, com espessura de casca de 1,1 e 0,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Esquema A adaptado de Rezende *et al.* (2016); esquemas B, C, D baseados segundo descrições de Monnerat *et al.* (1999) e Larink e Bilinski (1989).

## 1.4. A estrutura e composição das cutículas que compõem a casca dos ovos de Hexapoda

### 1.4.1. Cutícula serosa

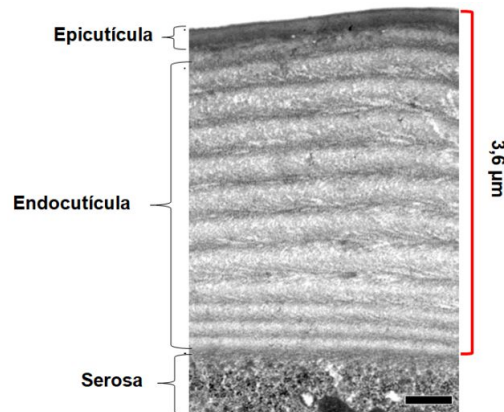
Logo no início do desenvolvimento embrionário dos insetos ocorre a formação de um blastoderma celular indiferenciado que se organiza na região periférica do ovo. O blastoderma celular se diferencia dando origem as células da serosa e do âmnio (tecidos extra-embrionários presentes na maioria dos insetos) e do embrião. Em seguida, as células da serosa migram e começam a englobar o embrião e o âmnio. Após envolver o embrião por completo, a serosa secreta a cutícula serosa, matriz extracelular que passa a compor a camada mais interna da casca dos ovos (Figura 8). Essa cutícula é sintetizada ainda no

primeiro terço da embriogênese (Handel *et al.*, 2000; Panfilio, 2008; Rezende *et al.*, 2016, 2008).



**Figura 8: Processo de formação da cutícula serosa durante a embriogênese inicial de insetos.** Desenhos esquemáticos de seções transversais do meio do embrião. O blastoderma celular diferencia-se nas células da serosa, âmnio e do embrião. As células da serosa passam a envolver o embrião por completo e então secretam a cutícula serosa. Adaptado de Rezende *et al.* (2016).

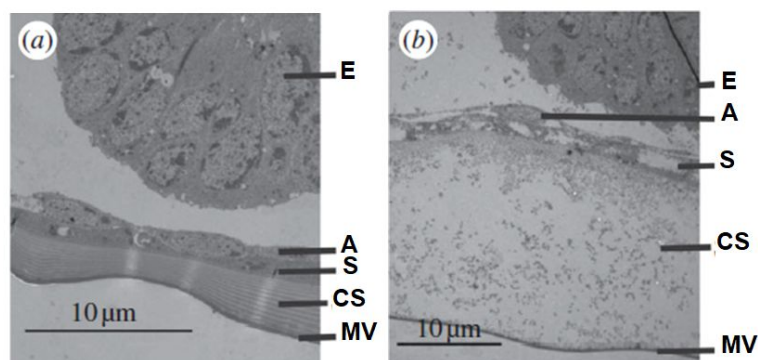
Na maioria dos insetos, a cutícula serosa apresenta duas camadas, uma mais externa e fina denominada de epicutícula e uma camada mais interna, bem estratificada e espessa, conhecida como endocutícula (Figura 9) (Rezende *et al.*, 2016). Acredita-se que a epicutícula seja composta por proteínas e lipídeos (Beckel, 1958; Slifer, 1937); a endocutícula é composta por quitina (Farnesi *et al.*, 2015; Jacobs *et al.*, 2013) e também por proteínas (Rezende *et al.*, 2016), conforme será detalhado abaixo.



**Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão da cutícula serosa de *Tribolium castaneum*.** A barra vermelha indica a espessura da cutícula. O corte transversal mostra na porção interna as células da serosa. Seguida da endocutícula, composta de quitina e provavelmente proteínas, região estratificada, espessa e com lâmelas com eletrodensidade alternada. A camada mais externa é a epicutícula que seria composta por proteínas e lipídeos. Barra de escala = 0,5 µm. Adaptado de Rezende *et al.* (2016).

Quitina é um polissacarídeo estrutural presente no exoesqueleto de artrópodes e na matriz peritrófica do intestino de vários insetos (Merzendorfer e Zimoch, 2003). A presença de quitina na cutícula serosa já foi comprovada em

ovos da espécie de Orthoptera *Acheta domesticus* (McFarlane, 1960) e *Melanoplus differentialis* (Jahn, 1935) e nos Diptera *Aedes aegypti*, *An. aquasalis*, *Culex quinquefasciatus* (Farnesi *et al.*, 2015) e *An. gambiae* (Goltsev *et al.*, 2009), contudo para essas espécies não foi descrito em qual camada este polissacarídeo se encontra. Jacobs *et al.* (2013), mostrou a presença de quitina na endocutícula da cutícula serosa, através do silenciamento gênico por RNAi parental do gene *quitina sintase 1*. Ovos silenciados apresentaram cutícula serosa amorfa e sem estratificação, diferente do que é naturalmente observada em ovos selvagens (Figura 10).



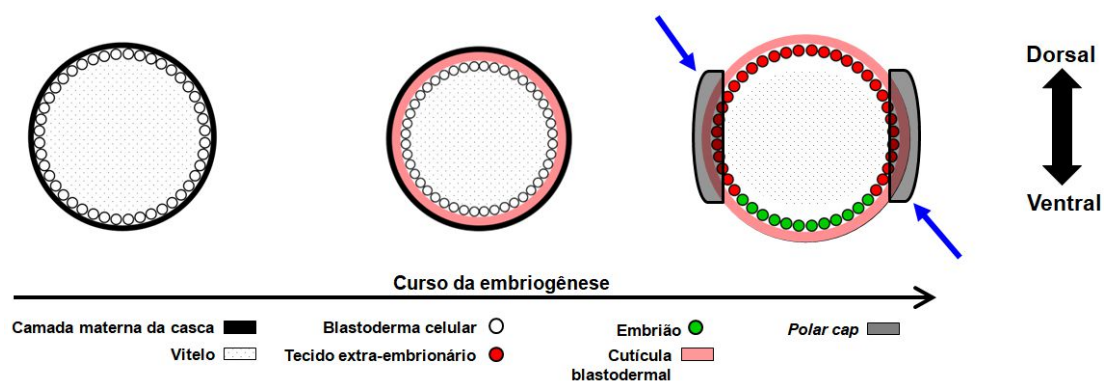
**Figura 10** Cutícula serosa de ovos de *T. castaneum*. A: ovos selvagens. B: ovos silenciados para quitina sintase 1. E: embrião, A: âmnion, S: serosa, CS: cutícula serosa, MV: membrana vitelínica (uma das camadas da casca de origem materna). Adaptado de Jacobs *et al.* (2013).

Apesar dos avanços realizados nos últimos anos, sobre a relevância e a composição da cutícula serosa de insetos ainda encontramos lacunas a serem respondidas. Até o presente momento, a presença de lipídeos na composição da cutícula serosa não foi confirmada (Rezende *et al.*, 2016). Contudo, evidências genéticas e histoquímicas indiretas apontam para a presença dessas biomoléculas na cutícula serosa de espécies das ordens Orthoptera (Slifer, 1937), Hemiptera (Beament, 1949), Diptera (Goltsev *et al.*, 2009) e Coleoptera (Rezende, 2008). O Diptera *An. gambiae*, um transcriptoma realizado com células da serosa mostrou que o gene *elovl* é um dos mais expressos nessas células, durante o estágio de síntese da CS (Goltsev *et al.*, 2009; Rezende, 2008). O Coleoptera *Tribolium castaneum*, análises de bioinformática apontavam que dos 18 genes *elovl* encontrados no genoma, quatro deles (*Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04*) seriam expressos durante a embriogênese (Vargas, 2015). Experimentos de RT-PCR com esses quatro genes confirmaram a expressão dos mesmos na embriogênese inicial.

Além disso, ensaios de hibridização *in situ* mostraram a expressão desses quatro genes nas células da serosa (Vargas, 2015). Estes genes codificam enzimas ELOVL que atuam na via de síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa, importante para a formação de diferentes lipídeos e hidrocarbonetos (Bond *et al.* 2016). A relevância dos genes *elovl* e a possível presença de lipídeos na cutícula serosa serão exploradas no Capítulo 1 desta tese.

#### 1.4.2. Cutícula blastodermal

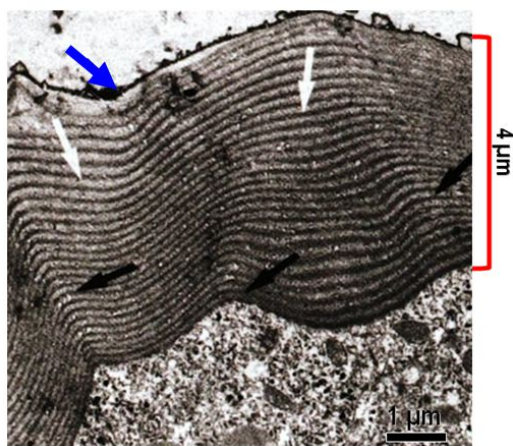
Diferente dos insetos, colêmbolos apresentam uma cutícula blastodermal que é produzida em fase bem inicial da embriogênese pelas células do blastoderma indiferenciado ou pelas células do blastoderma diferenciado, dependendo da espécie. O blastoderma diferenciado é constituído por células do tecido extraembrionário e células do embrião. Os ovos de colêmbolos absorvem água durante o início de sua embriogênese o que acarreta no aumento do volume dos ovos. Este aumento ocasiona no rompimento das camadas da casca de origem materna. A casca rompida forma os *polar caps* (capas polares) que ficam nas extremidades dos ovos; assim a cutícula blastodermal passa a ser a única estrutura responsável pela proteção do embrião de colêmbolos em desenvolvimento (Figura 11) (Machida, 2006; Rezende *et al.*, 2016).



**Figura 11: Processo de formação da cutícula blastodermal durante a embriogênese inicial de Collembola.** Desenhos esquemáticos de seções transversais do meio do embrião. O blastoderma celular secreta a cutícula blastodermal. O aumento do volume dos ovos acarreta o rompimento da parte materna da casca, originando os *polar caps* (setas azuis). O blastoderma se diferencia em células do embrião e extra-embriônicas. A cutícula blastodermal passa a proteger o embrião. Em outras espécies, primeiro o blastoderma se diferencia para depois produzir a cutícula blastodermal. Adaptado de Rezende *et al.* (2016).

Na literatura não há informações sobre a composição da cutícula blastodermal dos colêmbolos. Contudo, imagens de microscopia eletrônica de transmissão apontam para uma semelhança estrutural entre a cutícula

blastodermal do colêmbolo *Anurida maritima* (Figura 12) e a cutícula serosa de insetos (Figura 9). Assim como a cutícula serosa, a cutícula blastodermal é estratificada, possuindo uma epicutícula fina e eletro densa e uma endocutícula espessa composta de diversas camadas com eletro densidade alternada.



**Figura 12: Microscopia eletrônica de transmissão da cutícula blastodermal de *A. maritima*.** A barra vermelha indica a espessura da cutícula. Setas brancas e pretas indicam, respectivamente, as camadas claras e escuras da endocutícula. A seta azul indica a epicutícula, delgada e eletro densa. Barras de escala: 1 µm. Retirado de Tamarelle (1981).

## 1.5. O papel fisiológico das camadas da casca de origem pós-zigótica para a conquista do ambiente terrestre

### 1.5.1. Cutícula serosa de insetos

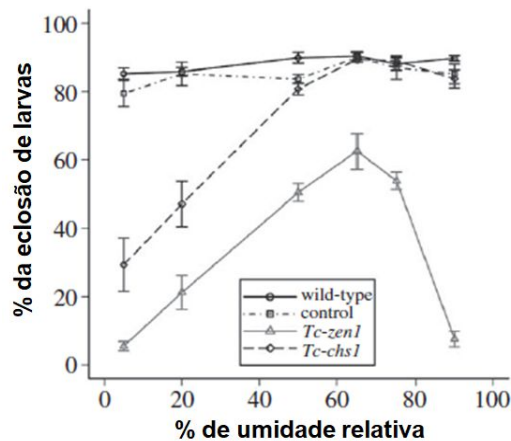
A cutícula serosa já foi descrita em diferentes ordens de insetos com representantes terrestres e do meio aquático como: Archaeognatha, Zygentoma, Ephemeroptera, Zoraptera, Dermaptera, Plecoptera, Orthoptera, Grylloblattodea, Embioptera, Phasmatodea, Isoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Psocodea, Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (Chapman *et al.*, 2013; Goltsev *et al.*, 2009; Hartley, 1962; Machida, 2006; Rezende *et al.*, 2016, 2008; Slifer, 1937; Vargas *et al.*, 2014). Sabe-se que esta estrutura é um componente importante para garantir a proteção dos ovos contra a perda de água, como será exemplificado a seguir para dois insetos que apresentam ecologias bastante diferentes (Jacobs *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2014).

Ovos de mosquitos são depositados na água. No início da embriogênese, quando os ovos apresentam apenas as camadas de origem materna como revestimento, os ovos são altamente permeáveis e absorvem água do ambiente (Clements, 1992). Contudo, após a produção da cutícula



serosa, o fluxo de entrada de água nos ovos cessa, os ovos têm a sua perda de água reduzida e podem manter sua viabilidade quando expostos a condições de forte estresse hídrico, em ambiente seco (Farnesi *et al.*, 2017; Goltsev *et al.*, 2009; Rezende *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2014).

A função da cutícula serosa e as bases moleculares que estão envolvidas com sua formação foram descritas em *T. castaneum* (Jacobs *et al.*, 2013). Os ovos deste besouro são depositados em farinha ou estoques de grãos, preferencialmente com umidade elevada. Entretanto, diferente dos mosquitos, os ovos desse besouro perdem água durante a embriogênese, ainda que numa taxa bem pequena (Santos, dados não publicados). Nesse besouro o gene *Tc-zerknüllt1* (*Tc-zen1*) codifica o fator de transcrição que é responsável pela especificação da serosa (van der Zee *et al.*, 2005). Através do silenciamento gênico parental de *Tc-zen1* via RNAi, foi possível bloquear a formação da serosa e conseqüentemente a cutícula serosa. Os ovos silenciados para *Tc-zen1*, quando expostos a 5% de umidade relativa (UR) a 35 °C, apresentaram apenas 5% de viabilidade. Já ovos controle, nas mesmas condições, apresentaram 80% de viabilidade. Este resultado evidenciou o papel crucial da cutícula serosa para a proteção contra a perda de água em insetos. Os autores mostraram também que o silenciamento gênico de *Tc-chs1* afeta a viabilidade dos ovos uma vez que interfere na formação e estruturação da cutícula serosa (que apresenta quitina em sua composição), conforme mencionado acima (vide item 1.4.1). Grupos de ovos silenciados para esse gene, quando mantidos a 35 °C e 5% UR, têm sua viabilidade reduzida e apenas 30% dos ovos são capazes de eclodir (Figura 13) (Jacobs *et al.*, 2013).



**Figura 13: Percentual de eclosão de ovos expostos a diferentes umidades relativas a 35°C.** Estão representadas as taxas de eclosão dos grupos de ovos selvagens (círculos pretos), ovos de fêmeas injetadas com dsRNA inespecífico (sequência de plasmídeo vetor) (quadrados cinza), ovos silenciados para *Tc-zen1* (triângulo cinza) e ovos silenciados para *Tc-chs1* (hexágono cinza). As barras indicam o erro padrão entre 3 a 10 réplicas de 96 ovos cada. Retirado de Jacobs *et. al.* (2013).

### 1.5.2. Cutícula blastodermal de *Collembola*

Não há na literatura trabalhos que descrevam o papel fisiológico da cutícula blastodermal em colêmbolos. Contudo, em outros grupos de artrópodes, como os miriápodes, a cutícula blastodermal é descrita como uma estrutura resistente e que atua como barreira contra a entrada de reagentes utilizados no tratamento histológico (Anderson (1973) apud Rezende *et al.* (2016)). A cutícula serosa de *Hanseniella agilis* (Miriapoda) é descrita como uma estrutura fina e impermeável a corantes aquosos (Tiegs, 1940). Estas descrições apontam para uma possível similaridade de função entre a cutícula blastodermal e a cutícula serosa dos insetos. O Capítulo 2 desta tese explora o papel fisiológico da cutícula blastodermal dos colêmbolos *Orchesella cincta* e *Folsomia candida*.

## 2. JUSTIFICATIVA E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

A formação de cutículas pós-zigóticas é um padrão mantido dentro de Hexapoda. O papel da cutícula serosa dos insetos para a impermeabilização é bem descrito, contudo ainda há lacunas sobre a sua composição. No caso da cutícula blastodermal dos colêmbolos, não há informações sobre seu papel fisiológico. Esta tese se dispõe a desbravar alguns aspectos sobre a cutícula serosa e averiguar se existe associação entre a cutícula blastodermal e a proteção contra a perda de água.

O primeiro capítulo buscou definir o exato momento de formação da cutícula serosa, além de descrever a relevância de genes *elongase* para a proteção dos ovos contra perda de água na espécie *T. castaneum*. O segundo capítulo trata da relevância da formação da cutícula blastodermal para proteção de ovos contra perda de água em ovos de duas espécies de colêmbolos. O Apêndice A consiste de resultados preliminares da análise de hidrocarbonetos presentes em ovos de *T. castaneum*. O Anexo I consiste em um capítulo de livro (Rezende *et al.*, 2016) em que é feita uma revisão da literatura de diversos aspectos relacionados com a casca dos ovos de artrópodes; tema central dessa tese. O Anexo II é um artigo (Farnesi *et al.*, 2017), que foi publicado no período do curso de doutorado, através de colaborações.

### 3. OBJETIVO GERAL

Investigar aspectos moleculares e evolutivos da resistência à dessecação em ovos de Hexapoda.

#### 3.1 Objetivos específicos:

a) Avaliar o papel de genes *elovl* em ovos do Coleoptera *Tribolium castaneum*.

b) Avaliar a relevância da cutícula blastodermal em ovos de Collembola: *Orchesella cincta* e *Folsomia candida*.

#### **4. CAPÍTULO I – O GENE *Tc-elov104* PROTEGE OVOS DE *TRIBOLIUM CASTANEUM* CONTRA A PERDA DE AGUA**

Este capítulo descreve o papel do gene *Tc-elov104*, na viabilidade de ovos de *T. castaneum* em baixa umidade relativa. Os resultados apresentados aqui foram obtidos no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob orientação do Professor Dr. Gustavo Rezende.

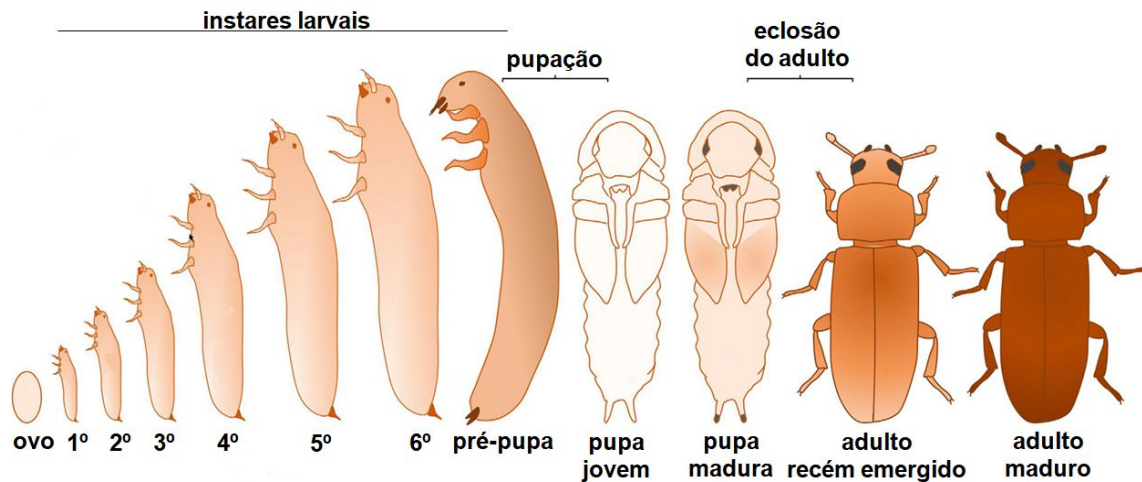
## 4.1. INTRODUÇÃO

### 4.1.1. Modelo de estudo: coleóptera *T. castaneum*

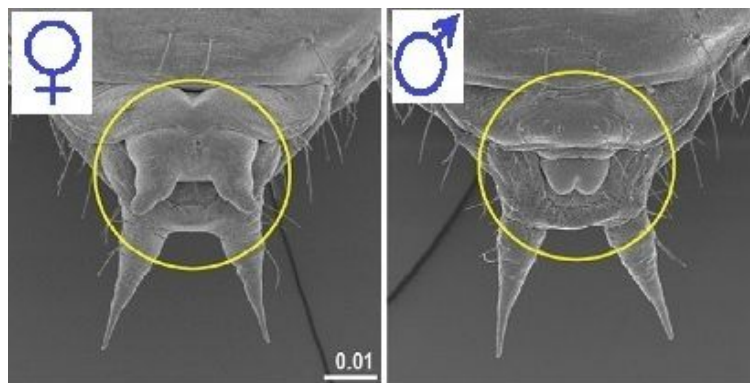
O coleóptero *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) é popularmente conhecido como besouro-castanho, devido à coloração vermelho-acastanhado dos adultos (Lorini *et al.*, 2015; Van Emden, 2013). A espécie foi descrita pela primeira vez em 1797, por Herbst sendo denominada inicialmente como *Colidium castaneum*. A primeira designação da espécie como *Tribolium castaneum* foi feita em 1855 (Good, 1936). É uma espécie cosmopolita, distribuída especialmente por regiões tropicais, entre a América do Sul, a África e a Ásia (Van Emden, 2013). Acredita-se que esta espécie tenha sua origem na região da Índia e antes da sua adaptação aos hábitos humanos, *T. castaneum* habitava troncos apodrecidos e cascas de árvores e alimentava-se de fungos (Dawson, 1977; Good, 1936). É considerada uma praga secundária, ou seja, depende da ação de outras espécies para se instalar em grãos armazenados. Alimenta-se principalmente de grãos quebrados, rações e farinhas (Lorini *et al.*, 2015).

A duração dos estágios de vida de *T. castaneum* (de ovo até adulto) (Figura 14) varia de acordo com a temperatura. Quando mantidos a 30 °C, o ciclo de vida dura 27 dias; e a 20 °C chega a 148 dias (Bucher, 2009). Contudo, não são capazes de se desenvolver ou se reproduzir em temperaturas abaixo de 18 °C (Van Emden, 2013). Os adultos medem de 2,3 mm a 4,4 mm de comprimento. Entre macho e fêmea o dimorfismo sexual não é evidente. No estágio de pupa, as fêmeas se distinguem dos machos pela presença de lóbulos genitais salientes (Figura 15). Já nos adultos, é possível distinguir-se machos de fêmeas devido à presença de uma glândula existente na porção ventral do fêmur (Hinton, 1942).

As larvas são branco-amareladas e podem medir até 7 mm de comprimento. O número de instares larvais depende das condições de crescimento, mas pode variar entre cinco e nove (Lorini *et al.*, 2015). As fêmeas produzem cerca de 10 a 20 ovos por dia e a partir de uma única cópula são capazes de ovipor por 150 dias seguidos (Michalczyk *et al.*, 2010). Os ovos são depositados em fendas de paredes ou na sacaria sobre os grãos (Lorini *et al.*, 2015).



**Figura 14: Estágios de vida do besouro *Tribolium castaneum*.** O ciclo de vida consiste em: ovo, seis instares larvais, pré-pupa, pupa jovem, pupa madura, adulto recém-emergido e adulto maduro. Os diferentes estágios não estão na mesma escala. Adaptado de Walski *et al.* (2016).



**Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura dos lóbulos genitais de pupas macho e fêmea.** A pupa fêmea - à esquerda - distingue-se pelos lóbulos genitais salientes (circulado em amarelo). Na pupa macho - à direita - não ocorre essa saliência. Retirado de Dickinson (2018).

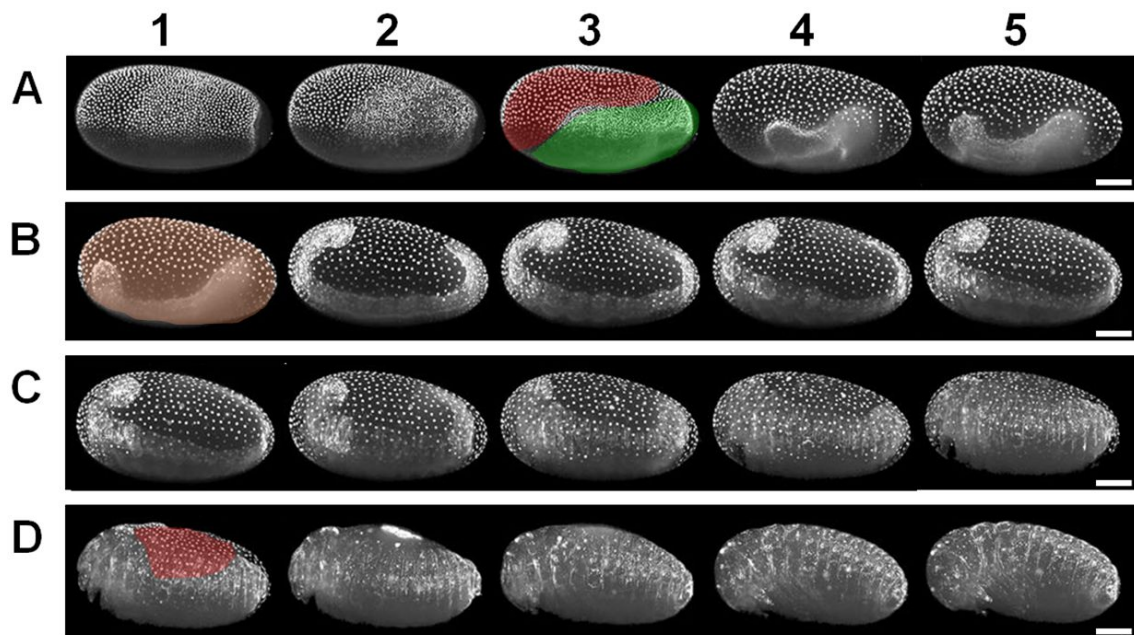
A embriogênese de *T. castaneum* se inicia assim que os ovos são postos e é finalizada com 3,6 dias a 30 °C (Shazali e Smith, 1986). O desenvolvimento embrionário desta espécie, como em todas as espécies de insetos, inicia-se a partir da fertilização do ovócito pelo espermatozoide. Os núcleos celulares masculino e feminino se fundem e formam o núcleo zigótico que sofre inúmeras clivagens mitóticas e formando os energídeos. Após diversas divisões os energídeos migram para a extremidade do ovo e formam o blastoderma sincicial (Chapman *et al.*, 2013; Klowden, 2013).

Esse sincício se celulariza, formando o blastoderma celular indiferenciado, onde todas as células são iguais. Em seguida o blastoderma celular se diferencia: a porção antero-dorsal dá origem às células da serosa, um dos tecidos extraembrionários. Já a região central e ventro-posterior

originarão as células da banda germinal (o embrião propriamente dito) e do âmnio, o segundo tecido extraembrionário (Handel *et al.*, 2000). A Figura 16 mostra toda a embriogênese de *T. castaneum* a partir dessa etapa. Essas mesmas etapas podem ser acompanhadas em cortes transversais na Figura 8, presente na Introdução Geral. Após a diferenciação do blastoderma se inicia o processo de gastrulação (Figura 16 A1). As células da serosa são maiores e se apresentam bem definidas, com núcleos grandes poliplóides e espaçados, já as células do embrião e do âmnio são menores e possuem núcleos pequenos e mais condensados (Figura 16 A1-3) (Benton *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 1994).

A serosa se estende ventro-posteriormente para envolver o embrião enquanto este se condensa ventralmente (Figura 16 A3-5). Ocorre a formação da dobra amniótica. A serosa se fecha, ocorre a separação da serosa e do âmnio e o embrião (banda germinal) começa a se alongar (Brown *et al.*, 1994). A partir desse estágio ocorre a formação da cutícula serosa (Figura 16 A4-5 e B1). O embrião se segmenta, finaliza o alongamento e em seguida a banda germinal começa a retrair (Figura 16 B2 até C1) (Benton *et al.*, 2013). A cabeça do embrião fica bem definida em relação ao tórax e a retração da banda germinal se finaliza (Figura 16 C2-5). A serosa se rompe na porção ventral e começa a reduzir de tamanho. Por fim, o embrião se fecha dorsalmente e a formação da larva é finalizada (Figura 16 D1-5) (Panfilio *et al.*, 2013).





**Figura 16: Embriogênese de *T. castaneum*.** Nas imagens de microscopia de fluorescência cada ponto branco indica um núcleo celular. Em todas as imagens a região anterior está para esquerda, posterior pra direita, parte dorsal pra cima e parte ventral pra baixo. Os planos mostram os quatro grandes eventos do desenvolvimento: A: gastrulação; B: alongamento (extensão) da banda germinal; C: retração da banda germinal e D: fechamento dorsal. Regiões pseudo coloridas em vermelho indicam células da serosa (A3 e D1); em verde indicam o embrião e o âmnio (A3). A marcação em laranja (B1) indica o estágio de formação da cutícula serosa. Nos painéis B e C as células da serosa também se encontram na parte ventral do ovo, apesar das imagens não mostrarem isso com clareza. As barras indicam 100  $\mu$ m. Imagens adaptadas de Strobl e Stelzer (2014).

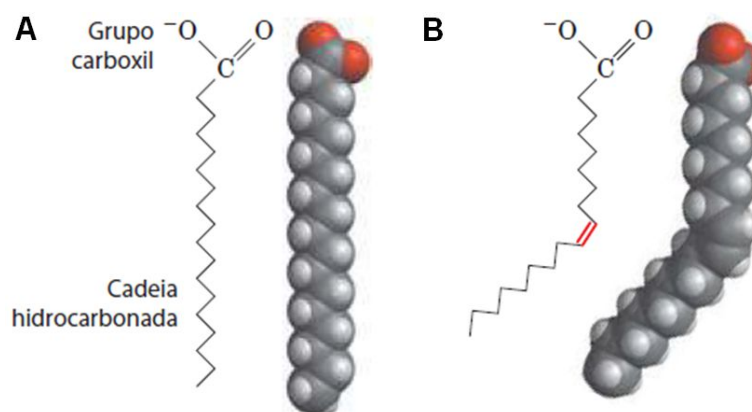
Além de sua relevância agroeconômica, o besouro-castanho é usado como organismo modelo em diferentes áreas de pesquisa há mais de 100 anos. Um ponto favorável à escolha da espécie para aplicações em laboratório é a fácil manutenção dos indivíduos (Brown *et al.*, 2009). *Tribolium castaneum* destaca-se também como um bom modelo para estudos na área de biologia do desenvolvimento graças a diversas ferramentas genéticas já estabelecidas como o RNAi sistêmico (Bucher *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2008) e CRISPR/CAS9 (Gilles *et al.*, 2015). Uma característica interessante sobre a ferramenta de RNAi em *T. castaneum* é a transferência de dsRNA injetadas em pupas ou fêmeas adultas para os seus ovos, o que acarreta no silenciamento direto dos genes alvo nos embriões em desenvolvimento. Este fenômeno é denominado RNAi parental (pRNAi) (Bucher *et al.*, 2002).

Há mais de 10 anos, o grupo do Dr. Gustavo Rezende utiliza o besouro *T. castaneum* como organismo modelo visando compreender como a cutícula serosa auxilia na proteção contra a perda de água, com um viés fisiológico, ecológico (Jacobs *et al.*, 2013) e genético (Cardozo, 2017; de Souza, 2014;

Rezende, 2008; Vargas, 2015; Xavier, 2018). Aqui esta espécie foi empregada para entender o papel de genes *e/ovl* na impermeabilização dos ovos.

#### 4.1.2. Ácidos graxos

Os ácidos graxos (AG) são definidos como ácidos carboxílicos associados a cadeias de hidrocarboneto (Figura 17) e compõem uma variedade de lipídeos como: triacilgliceróis, ésteres de ceras, fosfolipídeos e glicolipídeos. Podem ainda dar origem a hidrocarbonetos (alcanos e alcenos) e álcoois. Os AG podem ser classificados de acordo com o número de insaturações, com o tipo de insaturação (*cis* ou *trans*) presente na cadeia hidrocarbonada e de acordo com o comprimento da cadeia de carbono (Bond *et al.*, 2016; Nelson e Cox, 2014). Ácidos graxos de cadeia curta (SCFA, do inglês *short-chain fatty acids*) apresentam até cinco átomos de carbono na cadeia ( $\leq C5$ ); AG de cadeia média (MCFA, do inglês *medium-chain fatty acids*) apresentam entre seis e 16 átomos de carbono na cadeia (C6 a C16); AG de cadeia longa (LCFA, do inglês *long-chain fatty acid*) possuem entre 18 e 22 átomos de carbono na cadeia (C18 a C22); e AG de cadeia muito longa (VLCFA do inglês *very-long chain fatty acid*) apresentam mais de 22 átomos de carbono na cadeia ( $\geq C22$ ) (Zheng *et al.*, 2017).



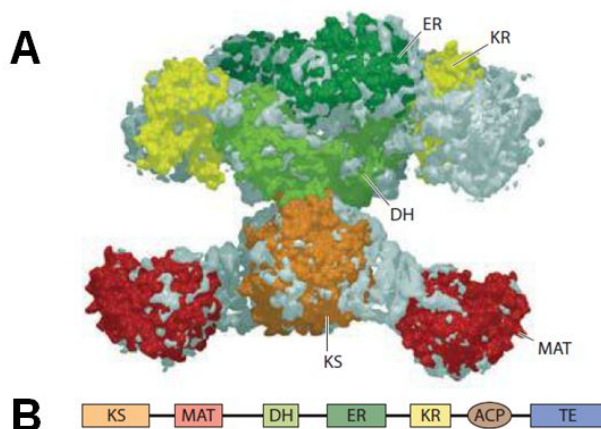
**Figura 17: Esquema da estrutura de dois ácidos graxos com 18 carbonos.** A: Ácido esteárico (ácido graxo saturado). B: Ácido oleico (ácido graxo insaturado, do tipo *cis*). Retirado de Nelson e Cox (2014).

Os AG são encontrados naturalmente com número par de átomos de carbono na cadeia. Isso se deve a via de síntese dessas biomoléculas que ocorre a partir da adição de dois átomos de carbono a cadeia. A via de síntese de AG se dá de duas maneiras: ácidos graxos com até 16 átomos de carbono (AG de cadeia curta e média) são sintetizados pela ácido graxo sintase (FAS,

do Inglês *fatty acid synthase*) (Nelson e Cox, 2014). Já AG com 18 ou mais carbonos são sintetizados graças à ação de um complexo de alongamento que apresenta quatro enzimas (Bond *et al.*, 2016; Jakobsson *et al.*, 2006).

#### 4.1.2.1 Via de síntese de AG mediada pela FAS

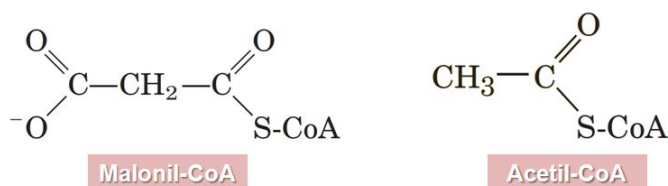
A biossíntese de AG mediada pela FAS ocorre no citosol das células e forma um AG com 16 carbonos, o ácido palmítico ou palmitato ( $C_{16}H_{32}O_2$ ). Nos organismos, esta enzima é encontrada em duas formas: FAS tipo I e tipo II. A FAS I é encontrada em animais e fungos e consiste de uma única cadeia polipeptídica multifuncional com sete sítios ativos, KS:  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintase; MAT: malonil/acetil-CoA-ACP-transferase; DH:  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-desidratase; ER: enoil-ACP-redutase; KR:  $\beta$ -cetoacil-ACP-redutase; ACP: proteína carreadora de grupos acila; e TE: tioesterase (Figura 18). Estes sítios encontram-se em diferentes domínios e atuam com atividades catalíticas distintas. Já em vegetais e em bactérias, encontramos a FAS do tipo II que se caracteriza por um sistema enzimático dissociado, ou seja, cada etapa da via de síntese é catalisada por uma enzima distinta (Bond *et al.*, 2016; Jakobsson *et al.*, 2006; Nelson e Cox, 2014). Neste trabalho, vamos dar enfoque ao processo de síntese catalisado pela FAS do tipo I, presente nos animais.



**Figura 18: Estrutura do complexo enzimático da enzima ácido graxo sintase do tipo I.** A: Estrutura quaternária da enzima, que atua como um homodímero. B: Arranjo linear dos domínios da enzima. KS:  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintase; MAT: malonil/acetil-CoA-ACP-transferase; DH:  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-desidratase; ER: enoil-ACP-redutase; KR:  $\beta$ -cetoacil-ACP-redutase; ACP: proteína carreadora de grupos acila; e TE: tioesterase. Retirado de Nelson e Cox (2014).

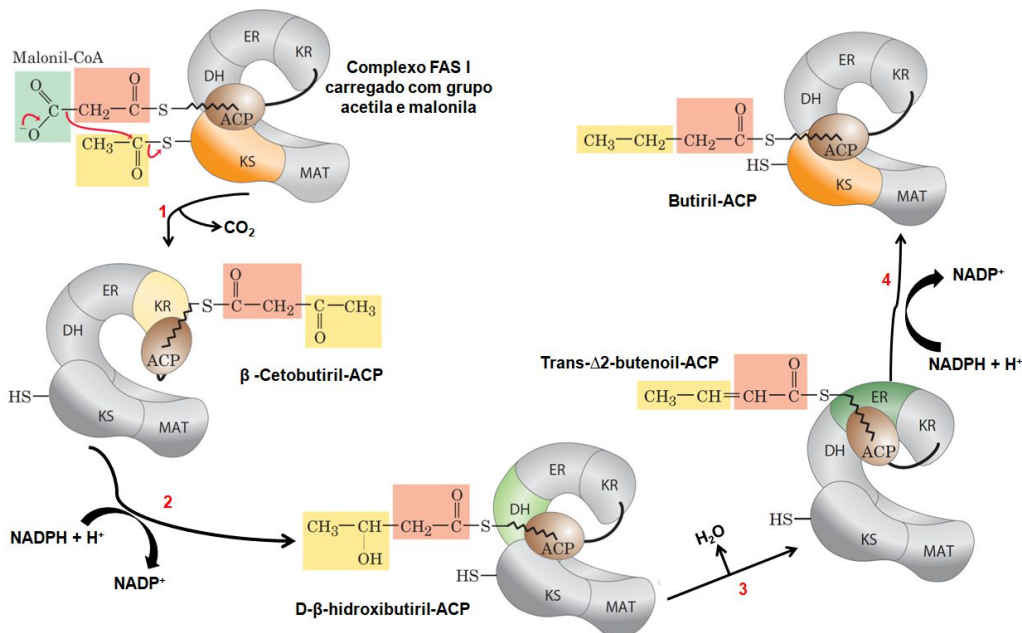
A biossíntese de ácidos graxos, mediada pela FAS I, é dependente de duas moléculas intermediárias, o malonil-CoA e o acetil-CoA que possuem, respectivamente, três e dois carbonos (Figura 19). Malonil-CoA é formado a

partir da adição de um grupamento carboxil (oriundo do bicarbonato) ao acetil-CoA através da ação da enzima acetil-CoA carboxilase (Nelson e Cox, 2014).



**Figura 19: Estrutura do Malonil-CoA e do Acetil-CoA.** Retirado de Nelson e Cox (2014)

Antes de iniciar o processo de formação de AG (Figura 20), duas moléculas são adicionadas ao complexo enzimático da FAS I, o acetil-CoA e o malonil-CoA. Na primeira etapa da síntese de AG, mediada pela ação do  $\beta$ -cetoacil-ACP-sintase (KS), essas duas moléculas são condensadas formando o grupo acetoacetil. Este grupo liga-se à ACP e forma o acetoacetil-ACP que sofre uma redução pela ação da  $\beta$ -cetoacil-ACP-redutase (KR) formando o D- $\beta$ -hidroxibutiril-ACP. O doador de elétrons nessa etapa é o NADPH. Na terceira etapa da via, o D- $\beta$ -hidroxibutiril-ACP é desidratado e duas moléculas de água são removidas dos carbonos C2 e C3 pela  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-desidratase (DH), formando o trans- $\Delta^2$ -butenoil-ACP agora apresentando uma ligação dupla. A última etapa da via é catalisada pela enoil-ACP-redutase (ER) e consiste de uma redução da trans- $\Delta^2$ -butenoil-ACP formando o butiril-ACP, uma molécula saturada que apresenta quatro carbonos. Novamente, o doador de elétrons é o NADPH. Dessa forma, quatro processos enzimáticos ocorreram: uma condensação, uma redução, uma desidratação e uma segunda redução. A formação do butiril-ACP finaliza a primeira rodada da via de síntese de AG. Após esta etapa, o mesmo retorna para o início do complexo enzimático para dar prosseguimento a síntese de AG maiores. Ao todo, sete ciclos de condensação e redução são necessários para a formação do palmitato, de 16 carbonos (16 C), que sai do complexo após ser formado (Nelson e Cox, 2014).



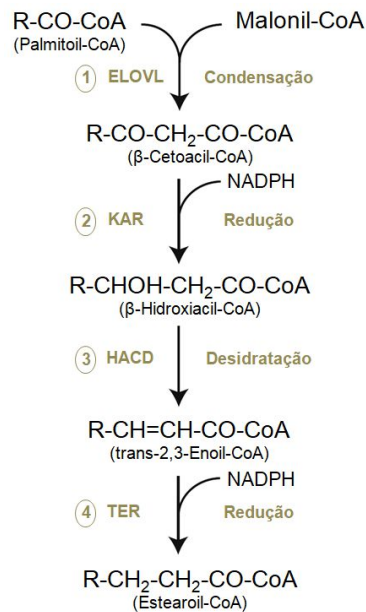
**Figura 20: Esquema da via de síntese de ácidos graxos mediada pela FAS I.** Esquema mostra a primeira rodada da via de síntese a partir do malonil-CoA e acetil-CoA até a formação de uma molécula de quatro carbono, butiril-ACP. O processo ocorre em quatro etapas. 1: condensação, 2: redução, 3: desidratação e 4: redução. Adaptado de Nelson e Cox (2014).

#### 4.1.3.2 Via de alongamento de ácidos graxos medida pelo complexo de alongamento

O alongamento de ácidos graxos ocorre a partir do palmitato (16 C), produzido pela FAS. Nas células animais, o complexo de alongamento de AG está presente no retículo endoplasmático liso e na mitocôndria e ocorre sempre com a adição de dois átomos de carbono a molécula. Este sistema depende da ação de quatro enzimas independentes: 1) β-cetoacil-CoA sintase (também chamada de elongase, ELO ou ELOVL, do inglês *elongation of very long chain fatty acid*); 2) β-cetoacil-CoA redutase (KAR, do inglês *ketoacyl-CoA reductase*); 3) β-hidroxiacil-CoA (HACD do inglês, *β-hydroxyacyl-CoA dehydratase*; e 4) 2-trans-enoil-CoA redutase (TER do inglês *trans-2,3-Enoyl CoA Reductase*) (Bond *et al.*, 2016; Jakobsson *et al.*, 2006; Nelson e Cox, 2014).

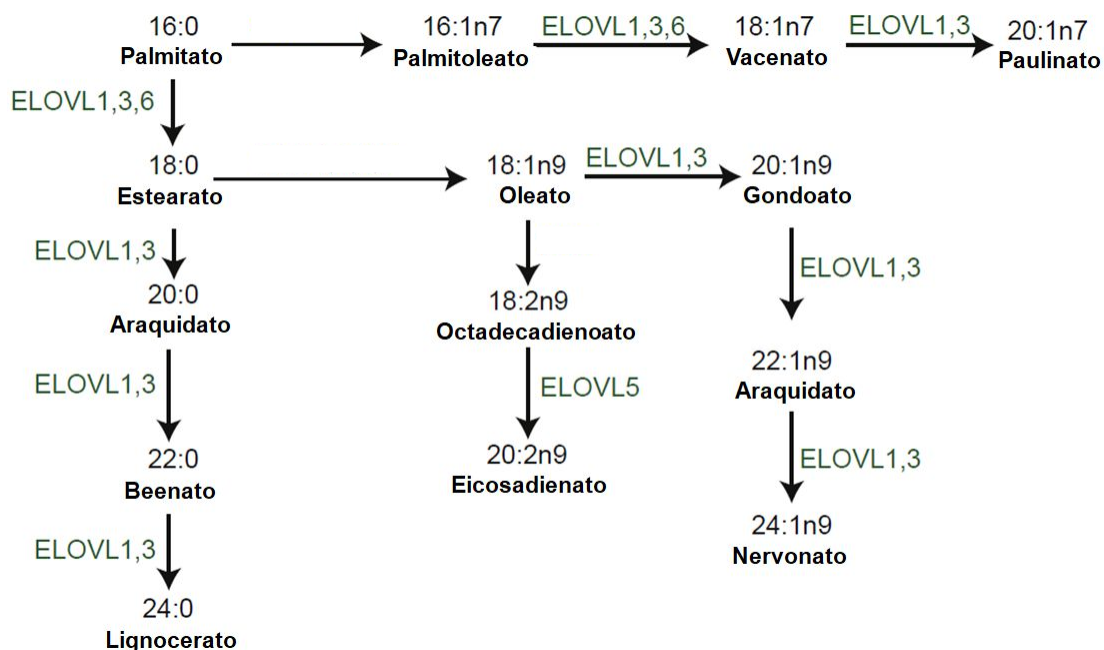
A primeira enzima da via de alongamento, a ELOVL, forma o β-cetoacil-CoA através da condensação do malonil-CoA e do palmitoil-CoA (16:0) com liberação de CO<sub>2</sub>. Na segunda etapa da via, o β-cetoacil-CoA (formado pela ELOVL) é reduzido e forma o β-hidroxilacil-CoA, pela ação da KAR tendo o NADPH como doador de elétrons. Posteriormente, o β-hidroxilacil-CoA sofre

uma desidratação catalisada pela HACD e forma o  $\text{trans-}\Delta^2\text{-enoil-CoA}$ . Por fim, uma nova redução ocorre na via de alongamento, agora mediada pela TER, tendo o NADPH como doador de elétrons, e o  $\text{trans enoil-CoA}$  é reduzido formando como produto final o  $\text{estearoil-CoA}$ , uma molécula de 18 carbonos (Figura 21). O alongamento de AGs com mais de 20 carbonos ocorre pela continuidade da via a partir da molécula de 18 carbonos recém-formada (Bond *et al.*, 2016).



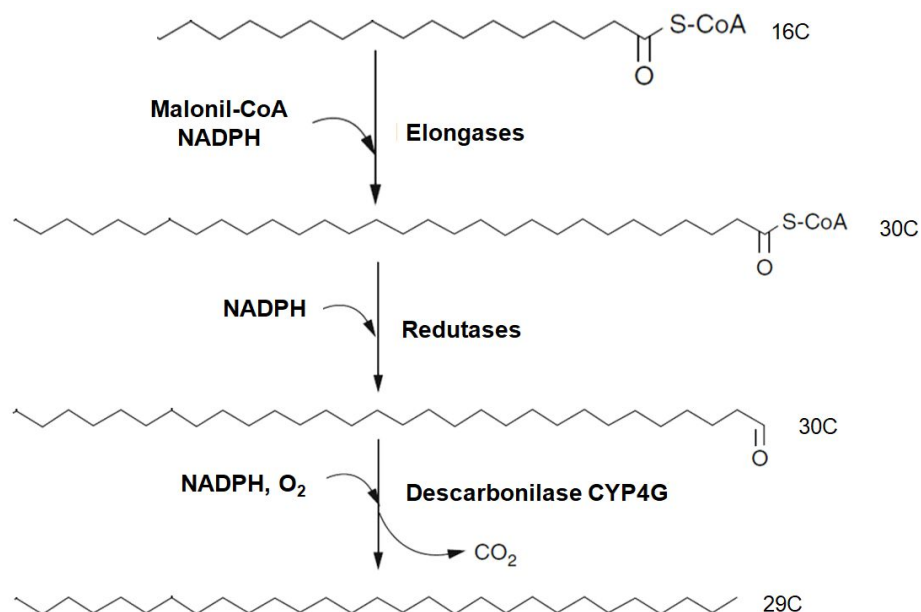
**Figura 21: Via de alongamento de ácidos graxos.** R: cadeia com 15 carbonos. Adaptado de Bond *et al.*, (2016).

É importante ressaltar que a etapa de condensação é a limitante da via de alongamento de AG e determina a formação de AGs de tamanhos e tipos de saturação diferentes. As isoformas de ELOVL atuam sob substratos específicos e de forma subsequente (Figura 22) (Bond *et al.* 2016).



**Figura 22: Via de alongamento de AG a partir de palmitato e substratos específicos de ELOVL de mamíferos.** Adaptado de Bond *et al.*, (2016).

Os AG de cadeia muito longa formados apresentam inúmeros destinos desde compor esfingolípídeos e glicerofosfolípídeos (Sassa e Kihara, 2014) como também atuam como precursores para a formação de hidrocarbonetos (HCs) cuticulares. Na formação de HCs os AG de cadeia muito longa são convertidos em aldeídos pela ação de uma redutase. Em seguida os aldeídos são reduzidos e descarbonilados pela ação de uma descarbonilase P450 (e.g. CYP4G), formando hidrocarbonetos (Figura 23) (Ginzel e Blomquist, 2016).



**Figura 23: Biossíntese de hidrocarbonetos a partir de AGs de cadeia muito longa em insetos.** Os ácidos graxos são sintetizados pela ácido graxo sintase (FAS) e alongados pelas enzimas da via de alongamento. Posteriormente, são reduzidos pela ação de uma redutase e por fim, descarbonilados por uma enzima P450 (CYP4G nesse caso). Adaptado de Ginzler e Blomquist (2016).

#### 4.1.3. Os genes *elovl*

Os genes *elovl* são responsáveis por codificar a enzima ELOVL (E.C. 2.3.1.199), responsável pela etapa limitante da via de síntese de AG de cadeia longa. Estas enzimas são proteínas membranares com 5-7 sítios transmembranares, encontradas em diversos organismos eucarióticos, de fungos a mamíferos, e apesar da pouca similaridade entre sequências de diferentes espécies, apresentam *motifs* bem conservados: HxxHH, KxxExxDT, HxxMYxYY e TxxQxxQ (Bond *et al.*, 2016; Jakobsson *et al.*, 2006; Leonard *et al.*, 2004).

Os genes *elovl* são encontrados em diferentes quantidades no genoma de diferentes organismos. Enquanto levedura e plantas apresentam três genes *elovl* (Haslam e Kunst, 2013; Leonard *et al.*, 2004), mamíferos apresentam sete parálogos em seu genoma (Bond *et al.*, 2016). Em insetos, o número de parálogos no genoma varia entre 13 e 21 genes (Futahashi *et al.*, 2019; Vargas, 2015; Zuo *et al.*, 2018).

São genes expressos numa variedade de tecidos. Em mamíferos, por exemplo, os genes *elovl* são expressos na mielina do tecido nervoso central, em células do fígado, no tecido adiposo, na pele, em células fotoreceptoras, na próstata, rim, pâncreas e glândula adrenal (Bond *et al.*, 2016; Guillou *et al.*,



2010; Tamura *et al.*, 2009; Vasireddy *et al.*, 2007). Em peixes são expressos no cérebro, fígado, ovário, testículos, intestino e brânquias (Monroig *et al.*, 2011) e na região cefálica de embriões em desenvolvimento (Monroig *et al.*, 2009). Na mosca da fruta, *D. melanogaster* os genes *elovl* já foram identificados no sistema nervoso, ovários, nos discos imaginais, no corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e nas gônadas sexuais (Jung *et al.*, 2007; Szafer-Glusman *et al.*, 2008). Na libélula, *Orthetrum albistylum*, os genes *elovl* são altamente expresso na epiderme (Futahashi *et al.*, 2019). No besouro *T. castaneum*, quatro genes *elovl* (*Tc-elovl01* a *04*) são expressos nas células da serosa durante a embriogênese (Vargas, 2015).

Os genes *elovl* são bem descritos em mamíferos. O gene *elovl1*, por exemplo, é relevante para a síntese de ceramidas e outros esfingolipídeos e afeta diretamente a mielinização do sistema nervoso (Bond *et al.*, 2016). O *elovl2* afeta diretamente na síntese de AGs com três ou mais insaturações e em camundongos, o *knockdown* de *elovl2* leva a infertilidade em machos e também acarreta em esteatose hepática (popularmente chamado de gordura no fígado) (Pauter *et al.*, 2014). Fenótipo similar foi observado na deleção dos genes *elovl5* e *elovl6* (Bond *et al.*, 2016). O gene *elovl3* é importante para a correta estruturação da barreira cutânea em ratos (Westerberg *et al.*, 2006). Já o gene *elovl4* é altamente expresso em células fotorreceptoras da retina (cones e bastonetes) e a deleção do gene *elovl4* acarreta na degeneração macular do olho (Zhang *et al.*, 2001). Esse mesmo gene tem papel direto na impermeabilização da epiderme. Em camundongos neonatos, a deleção de *elovl4* afeta a permeabilidade da epiderme, levando à desidratação e consequentemente a morte (Cameron *et al.*, 2007; Vasireddy *et al.*, 2007). O gene *elovl7* foi descrito mais recentemente e está associado ao alongamento de AG de 18-22 carbonos. A deleção deste gene acarreta numa diminuição do crescimento de células cancerígenas (Tamura *et al.*, 2009).

Apesar de bem descrito em mamíferos, há pouca informação sobre esta família gênica em insetos. A espécie que apresenta maior número de genes *elovl* com função descrita em *D. melanogaster*. Nesta espécie, foi descrito que o gene *eloF* tem papel crucial para a formação de ferômonios femininos e para o comportamento de corte (Chertemps *et al.*, 2007). Já o gene *bond* é relevante para a correta citocinese dos espermatozoides, fertilidade dos indivíduos

machos e para a síntese de ferômonios (Ng *et al.*, 2015; Szafer-Glusman *et al.*, 2008). Outra *elovl*, *noa*, afeta a fertilidade de adultos e acarreta na degeneração da retina, similar ao que é descrito em mamíferos quando do silenciamento de genes *elovl* (Jung *et al.*, 2007; Palu e Chow, 2018). Este mesmo gene *noa*, em *Bactrocera dorsalis*, regula a via de sinalização de *Toll/Imd* (Dong *et al.*, 2015). No besouro *Tenebrio molitor* foi observado que o silenciamento do gene *Tmelo1* acarreta na mortalidade de larvas (Zheng *et al.*, 2017). Na libélula, *Orthetrum albistylum* evidências moleculares apontam para o papel do gene *elovl17* na produção de cera que compõem o exoesqueleto (Futahashi *et al.*, 2019). No Hemiptera *Nilaparvata lugens*, quatro elongases (NiELO 2, 4, 8 e 16) são importantes para a formação de hidrocarbonetos cuticulares e seu silenciamento afeta diretamente na proteção contra a perda de água em ninfas da espécie acarretando o óbito dos animais em condições de baixa umidade relativa (Li *et al.*, 2019). Dessa forma, assim como em mamíferos, as elongases em insetos também têm papel relevante para a impermeabilização cuticular, de acordo com as recentes descrições em estágios pós-embrionários, mencionadas acima.

Acreditamos que os genes *elovl* também sejam importantes para a impermeabilização na fase de ovo. Resultados obtidos por Goltsev *et al.* (2009) apontaram que os genes *elovl* estariam envolvidos na formação da cutícula serosa de *An. gambiae*. Vargas (2015) confirmou a expressão de quatro genes elongase (*Tc-elovl01-04*) durante a embriogênese de *T. castaneum*, através de RT-PCR. E análises de hibridização *in situ*, realizadas no mesmo trabalho confirmaram que as quatro elongases são expressas nas células da serosa. Aqui, buscamos a compreender o papel destas quatro elongases para a impermeabilização de ovos do besouro *T. castaneum*.

## **4.2. OBJETIVO**

Avaliar aspectos associados à formação e composição da cutícula serosa no besouro *T. castaneum*.

### **4.2.1 Objetivos específicos**

1. Definir o momento de formação da cutícula serosa a 30 °C.
2. Investigar o papel dos genes *Tc-elov11*, *Tc-elov12*, *Tc-elov13* e *Tc-elov14* na composição da cutícula serosa.
  - 2.1. Avaliar o efeito do silenciamento dos quatro genes *elov1*, através de RNAi, na viabilidade de ovos em diferentes umidades relativas.

### **4.3. METODOLOGIA**

#### **4.3.1. Manutenção de *Tribolium castaneum* em laboratório**

Espécimes de *T. castaneum*, cepa Geórgia (GA-1), foram criados em estufa seca a  $30 \pm 2$  °C e 70 - 80% de umidade relativa. As fases imaturas e os adultos foram mantidos em potes plásticos de 20 x 14,5 cm com farinha de trigo obtida em mercados locais (marca Útil ou marca Dona Benta) que serviu como fonte de alimento.

Antes de ser utilizada, a farinha foi desinfectada 12h à - 70 °C, seguido por um período de 24 horas em estufa a 60 °C. Após esse período, a farinha foi peneirada em peneira de solo com malha de 300 ou 250 µm. Foram utilizados cerca de 300 gramas de farinha de trigo para até 6 g de besouros adultos ou 10 g de besouros imaturos. A cada duas semanas, a farinha de trigo foi trocada e os adultos separados dos estágios imaturos com uso das peneiras de solo com malha de 710 µm e 300 µm. Todas as peneiras utilizadas foram da marca Betel ISSO 3310/1.

#### **4.3.2. Obtenção de ovos**

A temperatura utilizada para obtenção dos ovos foi 30 °C; temperatura sob a qual os besouros são mantidos em laboratório e a que acarreta na maior taxa de sobrevivência da espécie. Nesta temperatura, o desenvolvimento embrionário de *T. castaneum* ocorre em aproximadamente 86,4 horas (Bucher, 2009).

Para a obtenção de ovos, pupas foram sexadas e separadas em potes plásticos (15x10 cm) com farinha de trigo esterilizada e peneirada (vide item 4.3.1), até se tornarem adultos. Após se tornarem adultos, machos e fêmeas foram transferidos para um mesmo pote plástico (15x10 cm), para realizarem a cópula. Os adultos foram mantidos em estufa seca a 30 °C e 70 - 80% de umidade relativa por tempo determinado, a critério da pesquisadora. Ao fim do processo, os adultos foram separados da farinha contendo os ovos com peneira de solo de 700 µm de malha. Os ovos em desenvolvimento foram mantidos em farinha na estufa até a realização dos experimentos, quando são separados da farinha com peneira de solo de 300 ou 250 µm de malha.

#### **4.3.3. Determinação da formação da cutícula serosa a partir da digestão por solução de hipoclorito de sódio**

Para confirmar o momento da formação da cutícula serosa, foi realizado oviposição com duração de uma hora. Ao final do processo, os ovos obtidos apresentavam idade que variava entre zero e uma horas de idade. Neste experimento foram utilizados grupos de ovos com idade de seis, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 horas após a oviposição (HAO), com margem de variação de uma hora a mais. A porção materna da casca dos ovos foi digerida por hipoclorito de sódio, mas o mesmo não ocorre com a cutícula serosa (Rezende, 2008; Vargas *et al.*, 2014).

As amostras foram lavadas em água corrente e água sanitária comercial (marca Q-Boa, 2% de cloro ativo), para a remoção de resíduos de farinha de trigo e então expostas a hipoclorito de sódio com 4 - 6% de cloro ativo (Vetec, V1019) por três horas seguidas. Após este período, foi contabilizado o número de ovos colapsados ou digeridos (indicando a falta da cutícula serosa) e o número de ovos intactos. Para cada estágio do desenvolvimento foram realizados entre três a quatro experimentos com número mínimo de ovos variando entre 18 a 48. O número total avaliado foi de 1362 ovos.

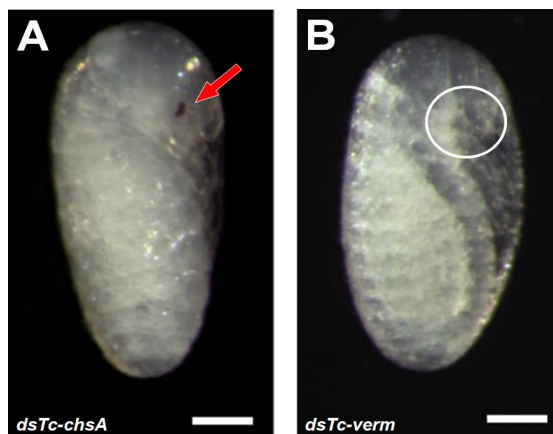
#### **4.3.4. Definição dos grupos controles e experimentais**

Os experimentos de silenciamento gênico foram realizados com os seguintes grupos controles:

1. Ovos selvagens, oriundos de fêmeas não injetadas;
2. Ovos silenciados para *Tc-elov107*, gene não expresso durante a embriogênese de *T. castaneum* (Vargas, 2015);
3. Ovos silenciados para *Tc-vermillion* (*Tc-verm*), gene que codifica a enzima triptofano 2,3-dioxigenase, responsável definir a coloração dos olhos nas larvas (Lorenzen *et al.*, 2002);
4. Ovos silenciados para *Tc-zerknüllt1* (*Tc-zen1*), gene que codifica o fator de transcrição responsável por especificar as células da serosa na embriogênese de *T. castaneum* (van der Zee *et al.*, 2005).

Para o gene *Tc-verm* a avaliação do fenótipo foi realizada a partir da contagem de larvas que eclodiram com ou sem pigmentação nos olhos (Figura 24). Já para *Tc-zen1* a confirmação do fenótipo de silenciamento se deu a partir de dois parâmetros: taxa de eclosão de larvas, e avaliação morfológica

dos embriões de acordo com descrições anteriores (Jacobs *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2005) através da fixação de ovos e marcação com DAPI (ver item 4.3.10 e 4.3.11).



**Figura 24: Larvas de *T. castaneum* em estágio final de formação.** Ambas as larvas são oriundas de ovos silenciados. A: larva silenciada para o gene *Tc-chsA* (gene quitina-sintase A) que afeta a formação da cutícula, mas não afeta a pigmentação dos ovos. B: larva silenciada para o gene *Tc-verm* que afeta a pigmentação dos ovos. A seta vermelha indica o olho da larva. O círculo branco indica a região em que deveria existir pigmentação ocular. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Retirado de Chaudhari *et al.*, (2015).

O grupo experimental foi caracterizado, inicialmente, pelo silenciamento múltiplo de quatro genes *Tc-elovI*: *Tc-elovI01*, *Tc-elovI02*, *Tc-elovI03* e *Tc-elovI04*. Posteriormente, o silenciamento isolado para cada um dos genes foi realizado. Além disso, realizamos o silenciamento em conjunto: de *Tc-elovI03* e *Tc-elovI04*; e *Tc-elovI01*, *Tc-elovI03* e *Tc-elovI04*.

#### 4.3.5. Síntese de RNA dupla fita (dsRNA)

Os fragmentos gênicos de interesse (*Tc-elovI01*, *Tc-elovI02*, *Tc-elovI03*, *Tc-elovI04*, *Tc-elovI07*, *Tc-verm* e *Tc-zen1*) foram clonados previamente (Vargas, 2015). No trabalho citado, todos os clones foram sequenciados para a confirmação da presença dos genes de interesse. A partir do material clonado, foram realizados PCRs usando os *primers* (iniciadores) T7.PGEM.H.F1 (TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGT) e PGEM.H.R1.T7 (TAATACGACTCACTATAGGGACGCGTTGGGAGCTCTC), em que a região promotora para a polimerase T7 está sublinhada. Os PCRs foram realizados com o kit GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, M7122). Foram utilizados os termocicladores TX96 (AMPLITHERM) ou 96-Well Thermal Cycler (Veriti, 9902). Antes de adicionar as amostras no aparelho, foi realizado um *hotstart*

manual, no qual se aguardou a tampa do termociclador atingir a temperatura de 105 °C e o bloco do aparelho atingir 95 °C. Após este processo, foram retirados os tubos do gelo e colocados direto para o bloco aquecido. Esse procedimento diminui a formação de bandas inespecíficas e dímeros de *primers*. A seguinte programação foi utilizada: 1° estágio a 95 °C por 3 minutos; 2° estágio de 37 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos; 3° estágio a 72 °C por 5 minutos; 4° estágio a 4 °C por 5 minutos e 5° estágio a 14 °C (estágio no qual as amostras foram retiradas).

Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados. Inicialmente, o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, 28903470) foi usado para purificação. Porém, devido ao baixo rendimento de material purificado, passamos a empregar o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, A9285).

A síntese de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) de *Tc-zen1* e *Tc-verm* foram realizadas inicialmente com o kit T7 RiboMAX™ Express RNAi System (PROMEGA P1700). Depois, por diversas razões, optamos por utilizar o kit Ambion® MEGAscript® RNAi Kit (AM1626). As dsRNAs sintetizadas foram quantificadas no Nanodrop. O aparelho foi calibrado com o solvente no qual as dsRNAs foram eluídas: no caso de dsRNAs sintetizadas com o kit T7 RiboMAX™, água *RNAse free*; e das dsRNAs sintetizadas com o kit MEGAscript®, o aparelho foi calibrado com *Elution Solution* disponibilizado pelo fabricante do kit. A quantificação da dsRNA foi realizada com o programa ssRNA.

#### **4.3.6. Injeção de dsRNA em fêmeas de *T. castaneum***

O silenciamento via RNAi foi realizada através da injeção de duplas-fitas de RNA (dsRNA). Os seguintes dsRNAs foram injetados: *Tc-elov107*, *Tc-verm*, *Tc-zen1* como grupos controles e *Tc-elov101* a *Tc-elov104* como grupo experimental. Em uma segunda fase, foram realizadas injeções de dsRNA individuais para cada um dos genes, *Tc-elov101*, *Tc-elov102*, *Tc-elov103* e *Tc-elov104*.

Para todos os silenciamentos, fêmeas de *T. castaneum* foram sexadas no estágio pupal e mantidas em farinha, separadas dos machos, até a execução das injeções. Após a primeira sexagem, foram realizadas entre um e

dois processos de verificação da sexagem para evitar possíveis erros na separação dos indivíduos. Uma ou duas semanas após a seleção de fêmeas, os potes com farinha foram peneirados com o intuito de averiguar a presença de larvas (indicando um possível erro de sexagem). O mesmo era feito nos potes de farinha que continham os machos. Os machos sexados foram mantidos em farinha até a realização dos experimentos.

Os dsRNA foram injetados no abdômen de fêmeas adultas virgens (variando entre 30 a 200 fêmeas, dependendo do gene e do experimento) em uma lupa com auxílio de um nanoinjetor Nanoject II (Drummond Scientific, 3-000-206A) empregando microagulhas feitas a partir de capilares de borossilicato (Drummond Scientific Company, #3-000-203-G/X) no *PC-10 Micropipette Puller* (Narishige). A configuração do equipamento foi de 59,8 volts no *heater 2*. As fêmeas utilizadas nos experimentos possuíam entre sete e 30 dias de emergência. A concentração de dsRNA variou entre 125 a 720 ng/ $\mu$ L, dependendo do experimento e do gene e o volume final injetado em cada fêmea foi sempre de 207 nL.

#### **4.3.7. Avaliação do fenótipo do silenciamento gênico**

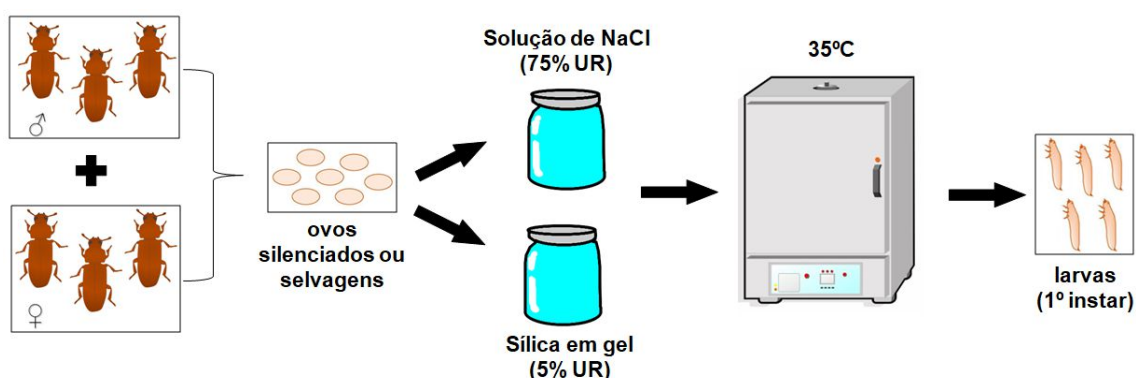
A avaliação do fenótipo do silenciamento gênico foi realizada a partir de ensaios fisiológicos de viabilidade dos ovos, como já descrito por Jacobs *et al.* (2013). Com o intuito era avaliar o efeito do silenciamento na proteção contra a perda de água, foi utilizado câmaras contendo solução supersaturada de NaCl para manter a umidade relativa (UR) fixa em 75% (Winston e Bates, 1960) e câmaras contendo sílica em gel (Vetec, 10-0051) para obter 5% de UR. Em ambas as câmaras um *cooler* de computador foi instalado para gerar um fluxo ininterrupto de ar e manter a UR constante. A UR e temperatura dentro das câmaras foram monitoradas com um termohigrômetro *Datalogger Temperature/Humidity* (Amprobe, TR200-A). As coletas de dados do instrumento eram realizadas a cada 15 minutos e, ao final de cada experimento, os dados eram exportados para o computador, com o auxílio de software próprio.

Após sete dias de injeção de dsRNA, os besouros (machos e as fêmeas injetadas) foram transferidos para uma farinha limpa. O mesmo procedimento foi realizado para os grupos controle (vide item 4.3.4). Oviposições diárias de



24 horas foram realizadas a 30 °C. Em um dos experimentos com o gene *Tc-zen1*, as oviposições foram realizadas em farinha de trigo com adição de propionato de cálcio 0,03% e fluconazol 0,6%.

Após esse período de oviposição, grupos de ovos com idade entre 0-24 horas após a oviposição (HAO) foram mantidos em placas de 96 poços dentro das câmaras de umidade de 75 ou 5% de UR a 35 °C. A temperatura de 35 °C foi empregada tendo em vista que o efeito de baixas umidades relativas é mais proeminente em altas temperaturas (Jacobs *et al.*, 2013). As coletas de ovos foram realizadas por até 50 dias após a injeção da dsRNA. A eclosão de larvas foi contabilizada para definir o efeito da umidade sob os ovos silenciados e controles (Figura 25). A eclosão das larvas foi avaliada por até três dias seguidos, a partir do terceiro dias em que os ovos foram transferidos para as placas de 96 poços.



**Figura 25: Esquema gráfico do ensaio com umidade controlada para avaliação de viabilidade após silenciamento gênico.** Ovos silenciados foram separados em dois grupos e mantidos em duas condições de umidade relativa: 5% e 75% UR.

Foram realizados entre dois a seis experimentos independentes, dependendo do gene. Cada injeção de dsRNA foi considerada um experimento independente. Em cada experimento foram realizadas de uma a oito coletas de ovos com idade entre 0 e 24 horas. Dependendo da quantidade de ovos obtidos após a oviposição de 24 horas, o número de ovos utilizados em cada condição de umidade relativa, por experimento, variou entre 48 a 100 ovos. O número total de ovos avaliados variou entre 96 e 1344 por experimento (considerando as duas umidades relativas em cada experimento).

#### **4.3.8. Efeito do silenciamento gênico para na sobrevivência das larvas**

A sobrevivência das larvas foi avaliada por 10 dias seguidos após a eclosão das mesmas. As larvas L1 que eclodiram permaneceram nas placas de 96 poços sem qualquer acesso a alimentação. Dois experimentos foram realizados com número amostral total variando entre 102 e 401 larvas, contabilizando os dois experimentos.

#### **4.3.9. Fixação de ovos sem casca**

Ovos foram lavados com água corrente e em seguida água sanitária comercial (marca Q-Boa, cloro ativo 2%), para remoção da farinha de trigo. Posteriormente, os ovos foram imersos em solução contendo 3,6 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato, do inglês *Phosphate-buffered Saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) com 1,2 mL de formaldeído 37% (concentração final de formaldeído de 8,9%) e 5 mL de heptano em frasco de vidro. É formada uma fase aquosa inferior contendo PBS e formaldeído e uma fase orgânica superior contendo o heptano. Os ovos ficam situados na interfase e foram assim fixados por 60 minutos em agitação constante de 220 rotações por minuto. Em seguida, a fase contendo PBS e formaldeído foi removida e 8 mL de metanol previamente refrigerado a -70 °C foram adicionados ao frasco, que então agitado vigorosamente por 2 minutos. Novamente duas fases foram formadas: a inferior contendo metanol e a superior contendo heptano. O tratamento com metanol faz com que as cascas dos ovos se quebrem. Os ovos sem casca descem para o fundo do vial e apenas estes foram coletados para serem utilizados. Os ovos foram lavados duas a três vezes em 3 mL de metanol a temperatura ambiente e então transferidos para um tubo *ependorf* de 1,5 mL contendo 1 mL de metanol e estocados a -20 °C até serem utilizados.

#### **4.3.10. Marcação nuclear com DAPI**

Os ovos previamente fixados mantidos em metanol foram reidratados sendo submetidos a lavagens gradativas com PBST (PBS com *Tween-20* 0,1%), transferidos para lâminas e em seguida foram marcados com ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen<sup>™</sup>, P36935). As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência com filtro UV de 450/490 nm.

#### **4.3.11. Confirmação do silenciamento gênico de *Tc-elovl04* através de RT-PCR**

A fim de confirmar o silenciamento de *Tc-elovl04* foram realizadas RT-PCRs com material genético extraído de ovos de *T. castaneum*. As dsRNA foram injetadas em fêmeas para a verificar se o fenótipo do silenciamento observado no ovo estava associado a um silenciamento gênico de RNAs depositados maternalmente ou produzidos pelo próprio ovo (*i.e.* pós-zigóticos). Foram selecionadas duas fases do desenvolvimento embrionário para a extração do RNA e síntese de cDNA: 0-6 horas de idade (período em que ocorre a presença de mRNAs maternos (Ribeiro, 2013) e 8-18 horas de idade (estágio de formação da cutícula serosa).

No genoma de *T. castaneum* são encontrados 18 parálogos de genes *Tc-elovl* (Vargas, 2015). A fim de confirmar se o fenótipo observado a partir da injeção de dsRNA direcionada para *Tc-elovl04* era específico do silenciamento desse gene ou se algum outro gene *Tc-elovl* também foi silenciado (efeito *off-target*), realizamos RT-PCR para os 18 genes. As sequências de *Tc-elovl* foram obtidas junto à plataforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabela 1).

**Tabela 1: Sequências *Tc-elovl* encontradas no genoma de *T. castaneum***

Nomenclatura*	SeqID <sup>#</sup>
<i>Tc-elovl01</i>	XM_962114.4
<i>Tc-elovl02</i>	XM_963543.4
<i>Tc-elovl03</i>	XM_963470.4
<i>Tc-elovl04</i>	XM_015983803.1
<i>Tc-elovl05</i>	XM_966451.3
<i>Tc-elovl06</i>	XM_963691.4
<i>Tc-elovl07</i>	XM_008201430.2
<i>Tc-elovl08</i>	XM_008201455
<i>Tc-elovl09</i>	XM_008201454.2
<i>Tc-elovl10</i>	XM_961434.3
<i>Tc-elovl11</i>	XM_008197754.2
<i>Tc-elovl12</i>	XM_008192621.2
<i>Tc-elovl13</i>	XM_968954.4
<i>Tc-elovl14</i>	XM_008192801.2
<i>Tc-elovl15</i>	XM_008196621.2
<i>Tc-elovl16</i>	XM_008202900.2
<i>Tc-elovl17</i>	XM_015985362.1
<i>Tc-elovl18</i>	XM_965421.4

Acesso ao banco de dados do NCBI: 11/01/2018.

\* Nomenclatura dos genes definida anteriormente por Vargas (2015).

<sup>#</sup> SeqID: identificador de sequência, do inglês sequence identifier.

Os *primers* (iniciadores) para os 18 genes foram desenhados com o auxílio das plataformas Primer3web (v 4.0.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) e Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) (Tabela 2). Os *primers* para *Tc-elovl01* a *17* foram desenhados entre introns. O gene *Tc-elovl18* foi desenhado no único éxon que apresenta. A posição de cada *primer* no gene foi visualizada no programa GenePalette. As extrações de RNA total dos ovos com 0-6 HAO e 8-18 HAO foram realizadas com TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, 15596-026) seguindo as informações do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado no Nanodrop. Padronizamos a concentração de RNAs entre 81 e 88 ng/μl para a síntese de cDNA.

O cDNA das amostras foi sintetizado com o kit Superscript III (Invitrogen, 18080-400) seguindo as especificações do fabricante. Foram utilizados 0,6 μL de oligo (dT) e 0,4 μL de *random hexamer primer*. Optamos por essa mistura de primers uma vez que cada tipo tem as suas vantagens e desvantagens:

oligo (dT) possibilita a síntese de cDNA apenas a partir do mRNA, mas, por conta de alguns mRNAs possuírem tamanho muito comprido e/ou pela presença de estruturas secundárias, o uso do oligo (dT) privilegia a síntese de cDNA para as regiões mais 3' dos mRNAs. Já com o *random hexamer primer* não ocorre essa síntese enviesada para a região 3', mas ele não é específico para mRNAs. As PCRs foram realizadas utilizando o kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, M7122) e o termociclador 96-Well Thermal Cycler (Veriti, 9902). Antes de adicionar as amostras no aparelho, realizamos um *hotstart* manual como descrito no item 4.3.5. A seguinte programação foi empregada: 1° estágio a 95 °C por 3 minutos; 2° estágio de 34 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos; 3° estágio a 72 °C por 5 minutos; 4° estágio a 4 °C por 5 minutos e 5° estágio a 14 °C (estágio no qual as amostras foram retiradas). Os fragmentos gênicos amplificados (amplicons) foram visualizados em gel de agarose 1,5% marcados com GelRed (Biotium, 41003) (1:40000), porém durante a execução dos experimentos foi observado uma alteração no tamanho das bandas em virtude do uso do GelRed. Devido a este problema, passou-se a utilizar o Brometo de Etídio 0,5 µg/mL. Os géis foram registrados em sistema digital de fotodocumentação após exposição à luz ultravioleta.

**Tabela 2: Lista dos primers para *Tc-elovI***

Gene	Primer Foward*	Primer Reverse*
<i>Tc-elovI01</i>	CCTCACCATAATTGCGACCT	TAATCACACTGCCGGAACAA
<i>Tc-elovI02</i>	GGCAAACCTTATGCTGGTGGT	TTTGACCGACTTTTGCTTCC
<i>Tc-elovI03</i>	TTGGAGATCCTCGGACAAAC	CCATTGCAGCAAGCAAGTAA
<i>Tc-elovI04</i>	CGCTTACGGCGTTAAGGTAG	CTTCGTCCTGGTGGTCATCT
<i>Tc-elovI05</i>	TCCACTCTCCACGTCATC	CGAATCGGAATACTCGCTTT
<i>Tc-elovI06</i>	GTAATGCCTATGTCCGTCTG	CCACTATATCACTGCGACTTT
<i>Tc-elovI07</i>	GTCAAGTCCAGGCCCTACTG	GCAAGGCGTGGAACATTATT
<i>Tc-elovI08</i>	GGGCTTGGAGATCATGAAA	CGCTAAAGAGTGCGATCATA
<i>Tc-elovI09</i>	GTTGTGCTGTCAAGCAATG	AAGGAACACCACCACATTAG
<i>Tc-elovI10</i>	TCTGATTCACGCACGAAAG	GCCGCAAGGCCATAATAA
<i>Tc-elovI11</i>	GCAAACCATACGACCTCAA	TGCAAGGAATGCGCTATAA
<i>Tc-elovI12</i>	CGATGAAACTCGACAGGATTAT	TGGAGTTGCGTGATGTATTT
<i>Tc-elovI13</i>	CTCGCCACTGTTCTACTTATC	AGACAGTGTTGCACGATTT
<i>Tc-elovI14</i>	ACACTCGGAGCAGGTATT	GCTGAGTTAGGTGCTTCTTC
<i>Tc-elovI15</i>	CGAGCCCTTGAACCTGAAATA	GATACGAACAGTCCTGGTTTAC
<i>Tc-elovI16</i>	GTACGAAGACACTCCGAAATC	CTCTAAGGTAAGTCGCTTTGAA
<i>Tc-elovI17</i>	CCTGTCCCAACCCTTATTATC	CCCAAAGACGCAACTAAGTA
<i>Tc-elovI18</i>	CTTCATCGAGCAGGACAAG	TAGCTGAACCAGGAGTAGAG

Todos os *primers* estão escritos no sentido 5' -> 3'.

#### **4.3.12. Verificação do silenciamento gênico de *Tc-elovI04* através de PCR em tempo real**

O silenciamento do gene *Tc-elovI04* foi avaliado por PCR em tempo real (RT-qPCR). O cDNA utilizado nas análises foi o mesmo obtido no item 4.3.11. Os *primers* (iniciadores) para RT-qPCR em tempo real foram desenhados com o auxílio da plataforma Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>). Além de *primers* para o gene *Tc-elovI04*, foram desenhados *primers* para os genes *Tc-elovI01*, *Tc-elovI02*, *Tc-elovI03*, *Tc-elovI05*, *Tc-elovI06* e *Tc-Rps6* (Tabela 3), devido ao resultado obtido no RT-PCR (vide Resultados). O RT-qPCR foi realizado utilizando o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, A25742) e os dados obtidos no sistema Real Time Step One (Applied Biosystems). O gene *Tc-Rps6* foi utilizado como normalizador de expressão.

**Tabela 3: Lista dos *primers* usados no RT-qPCR**

<b>Gene</b>	<b>Primer Foward</b>	<b>Primer Reverse</b>
<b><i>Tc-elov101</i></b>	ATCCTATGGCAATTCGGATG	CATGGCGTGATGGTACAG
<b><i>Tc-elov102</i></b>	AAATTCCTTGCAGGTGGTC	TGGTATTCCGGTCCCATC
<b><i>Tc-elov103</i></b>	CGTGAAGTATATGCCAGGAG	GCCACACAGAACTGTATCA
<b><i>Tc-elov104</i></b>	ACCACCATACAGATGATCCA	CCAATCCACCACACGAAG
<b><i>Tc-elov105</i></b>	TCCACTCTCCACGTCATC	CCGCCACCATGTAGTAGA
<b><i>Tc-elov106</i></b>	GTCTGGTTCGGAGTCAAAT	ACCATGATCGCCACAAAT
<b><i>Tc-Rps6</i></b>	CAACTTGAGTGTGCTTGCCC	GCTGGATTTTGGGTGCCTTG

Todos os *primers* estão escritos no sentido 5' -> 3'

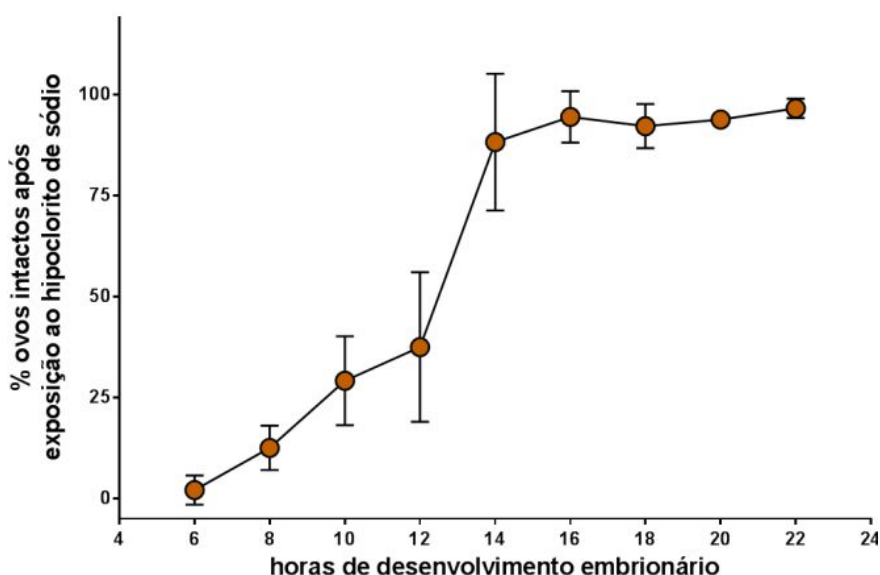
#### **4.3.13. Caracterização da sequência predita de aminoácido oriunda do gene *Tc-elov104***

A estrutura transmembranar da sequência proteica (XP\_015839289.1) predita do gene *Tc-elov104* foi estimada a partir da plataforma TMHMM Server v.2.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998). As características químicas e físicas da proteína foram preditas a partir da ferramenta ProtParam do ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005). Já a localização da proteína foi determinada pelo Euk-mPLoc 2.0 (Chou e Shen, 2010).

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. A cutícula serosa de *T. castaneum* é estabelecida a partir de 14 horas de embriogênese a 30 °C

A embriogênese de *T. castaneum* é finalizada em 86,4 horas, a 30 °C (Bucher, 2009). Com 6 horas de desenvolvimento embrionário (~ 7% do tempo total da embriogênese a 30 °C), os ovos de *T. castaneum* não resistem à ação do hipoclorito de sódio por três horas e todos são digeridos (Figura 26). Entre o período de oito e 14 horas de embriogênese (9,2 e 16,2% de embriogênese, respectivamente), foi observado um aumento progressivo no percentual de ovos intactos, o que indica uma alteração na estrutura física das cascas dos ovos. A cutícula serosa foi considerada minimamente formada com 14 horas de desenvolvimento, quando foi observado que mais de 80% de ovos ficam intactos. Nos tempos restantes analisados foi observado percentual similar de ovos intactos. Não podemos afirmar que com 14 horas a cutícula está completamente formada, uma vez que a partir desse estágio camadas adicionais da epicutícula são formadas, até estágio bem tardio da embriogênese (Konopova e Panfilio, comunicação pessoal).



**Figura 26: Percentual de ovos intactos após três horas de exposição ao hipoclorito de sódio.** Ovos foram mantidos se desenvolvendo a 30 °C até serem expostos à digestão. Cada ponto representa a média e o erro padrão de três ou quatro experimentos independentes com um mínimo de 42 ovos por réplica.



#### 4.4.2. Estabelecimento de condições de silenciamento gênico via dsRNA em *T. castaneum*

Antes da realização das análises com os genes *Tc-elov1* foram realizados experimentos com os diferentes controles: ovos selvagens e ovos oriundos de fêmeas injetadas para os genes *Tc-elov107*, *Tc-verm* e *Tc-zen1*. O gene *Tc-elov107*, que não é expresso na serosa (Vargas, 2015) e *Tc-verm*, que afeta apenas a cor dos olhos (Lorenzen *et al.*, 2002) foram usados como controles negativos. Já *Tc-zen1* foi planejado para servir como controle positivo, já que a ausência desse gene foi descrita como diminuindo a viabilidade dos ovos apenas em baixas umidades relativas (Jacobs *et al.*, 2013). Primeiro foram apresentados os dados para ovos selvagens, silenciados para *Tc-verm* e *Tc-zen1*. O controle negativo de *Tc-elov107* foi apresentado junto das outras elongases.

Inicialmente, as sínteses de dsRNA para os genes *Tc-verm* e *Tc-zen1* foram realizadas com o kit T7 RiboMAX Express RNAi System. Observamos um perfil atípico no gel de agarose das dsRNAs sintetizadas (Figura 27). As dsRNA para *Tc-verm* e *Tc-zen1* não apresentaram um tamanho de banda esperado (632 e 612 pb, respectivamente) e ocorreu um arrasto para ambos os dsRNA sintetizados e duas fortes bandas com tamanho menor que 75 pares de base.

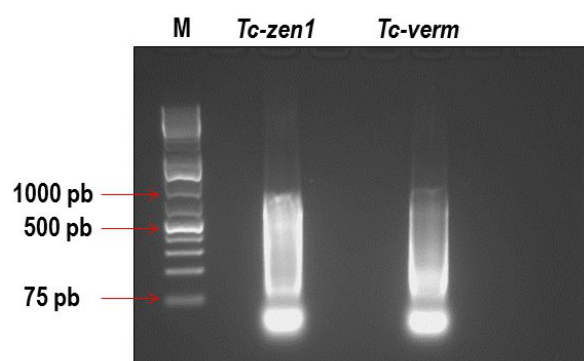
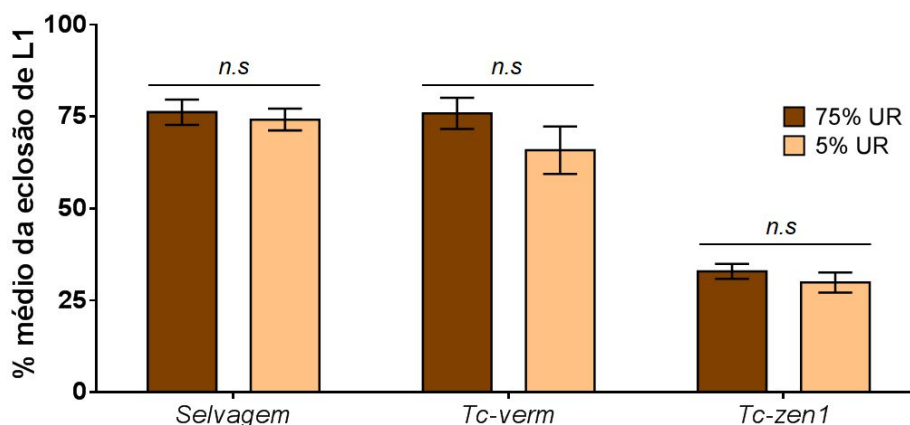


Figura 27: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-zen1* e *Tc-verm* com o kit T7 RiboMAX Express RNAi System através de eletroforese em gel de agarose. M: marcador de peso molecular.

Apesar do perfil no gel de agarose, à época esse kit de síntese de dsRNA era o único disponível no laboratório e esses mesmos dsRNAs foram injetados nas fêmeas, na quantidade de 0,2 µg por fêmea.

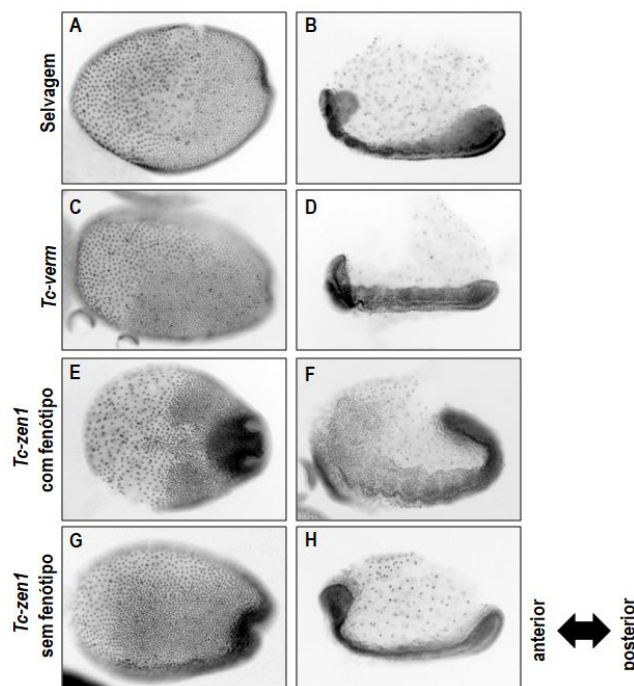
Os ensaios de viabilidade foram realizados com ovos oriundos das fêmeas injetadas com esses dsRNAs, além de ovos oriundos de fêmeas selvagens (Figura 28). Tanto ovos selvagens quanto os injetados para *Tc-verm* dsRNA apresentaram elevada viabilidade em 75 e 5% de UR. O silenciamento gênico para *Tc-verm* não foi confirmado neste primeiro experimento, uma vez que não foi observada a presença ou ausência da coloração dos olhos das larvas. Contudo, o silenciamento gênico de *Tc-zen1* mostrou uma baixa viabilidade dos ovos em ambas as UR. Este dado diverge do encontrado por Jacobs *et al.* (2013) que mostrou que ovos silenciados para *Tc-zen1* possuíam baixa viabilidade apenas quando mantidos a 5% de UR (vide Introdução e Discussão deste capítulo). Este resultado indica que o RNAi para *Tc-zen1* afetou o desenvolvimento embrionário de *T. castaneum*.



**Figura 28: Viabilidade de ovos selvagens e *prNAi* para *Tc-verm* e *Tc-zen1*.** Fêmeas selvagens ou injetadas com 0,2 µg de dsRNA foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas cada. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão de um experimento com 5 réplicas técnicas, obtidas entre 8 e 14 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui 96 ou 100 ovos cada, por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa, de acordo com *Two-way* ANOVA.

Além de avaliar o efeito do silenciamento gênico sob a viabilidade dos ovos, avaliou-se a morfologia dos embriões (Figura 29). Tanto na condição selvagem quanto *Tc-verm* RNAi, os ovos no início do estágio de gastrulação possuem células da serosa e as que darão origem ao embrião e âmnio bem definidas (Figura 29 A, C). No estágio mais tardio, de extensão da banda germinal, embriões *Tc-verm* RNAi possuem aspecto idêntico ao grupo selvagem (Figura 29 B, D).

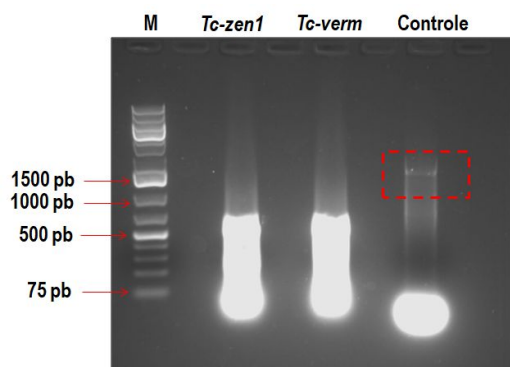
Em relação à *Tc-zen1* RNAi alguns ovos apresentaram fenótipo característico para este silenciamento, sem a presença de células da serosa, em estágio mais inicial da embriogênese (Figura 29 E) e embriões com “cabeça grande” no estágio de extensão da banda germinal (Figura 29 F) (van der Zee *et al.*, 2005). Por outro lado, alguns ovos apresentaram fenótipo normal similar a ovos selvagens, com células da serosa e do embrião bem definidas (Figura 29 G, H). Apesar de, inesperadamente, alguns ovos terem morfologia normal, estes resultados mostram que o silenciamento atingiu outros ovos.



**Figura 29: Morfologia de ovos selvagens, pRNAi para *Tc-vern* e *Tc-zen1* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores e menores indicam células da serosa e do embrião, respectivamente. A, C, E e G: embriões no estágio inicial da gastrulação. B, D, F e H: embriões no estágio de extensão da banda germinal. A-D e G-H: todos os ovos apresentam aspecto normal. E-F: embriões com alterações no desenvolvimento características do silenciamento de *Tc-Zen1*: ausência de células da serosa e células do embrião mais difusas (E) e embrião com cabeça avantajada (F). A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,2 µg por fêmea.

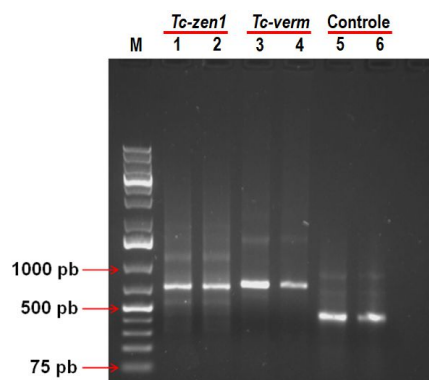
Uma vez que essa primeira síntese de dsRNA não apresentou um resultado satisfatório, realizamos uma nova síntese de dsRNA para *Tc-zen1* e *Tc-vern*. Esta nova síntese teve como controle positivo, um DNA molde disponibilizado pelo kit em uso (T7 RiboMAX Express RNAi System). Observamos, novamente, um arrasto no gel de agarose para as dsRNAs dos dois genes testados, sem tamanho de bandas esperadas (632 e 612 pb). A dsRNA do controle apresentou uma fraca banda com o tamanho esperado,

1800 pb (Figura 30), o que indicou a ineficiência do kit para síntese de dsRNA. A partir desse resultado, determinamos que os experimentos futuros de silenciamento gênico fossem realizados com o Ambion® MEGAscript® RNAi Kit (AM1626), já utilizado por outros grupos de pesquisa que trabalham com *T. castaneum*, apresentando grande eficiência.



**Figura 30: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-zen1* e *Tc-verm* com o kit T7 RiboMAX Express RNAi System através de eletroforese em gel de agarose.** M: marcador de peso molecular. A caixa em vermelho indica a banca esperada para o controle.

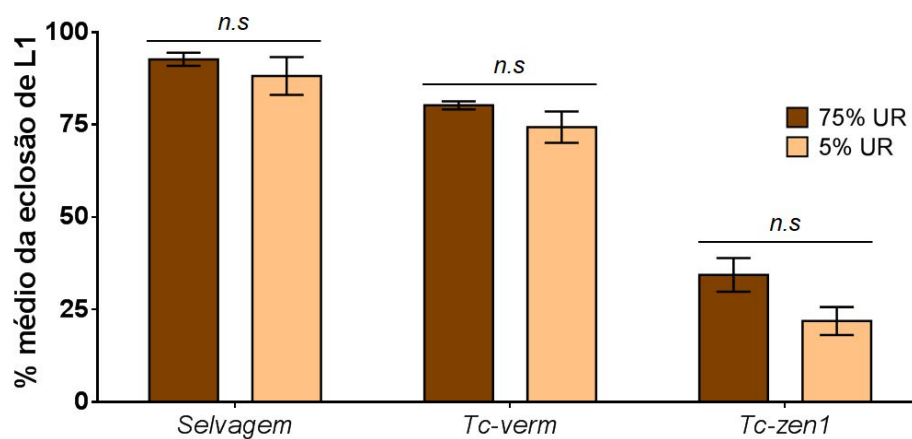
Novas dsRNAs para *Tc-zen1*, *Tc-verm* e o DNA controle foram sintetizadas com o novo kit (Ambion® MEGAscript® RNAi). As dsRNA sintetizadas para *Tc-zen1*, *Tc-verm* e DNA controle apresentaram tamanho de banda esperado: 632, 612 e 500 pares de base, respectivamente (Figura 31).



**Figura 31: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-zen1* e *Tc-verm* com o kit Ambion® MEGAscript® RNAi através de eletroforese em gel de agarose.** M: marcador de peso molecular. Números pares e ímpares indicam a primeira e segunda eluição, respectivamente, oriundas da etapa final do protocolo de síntese.

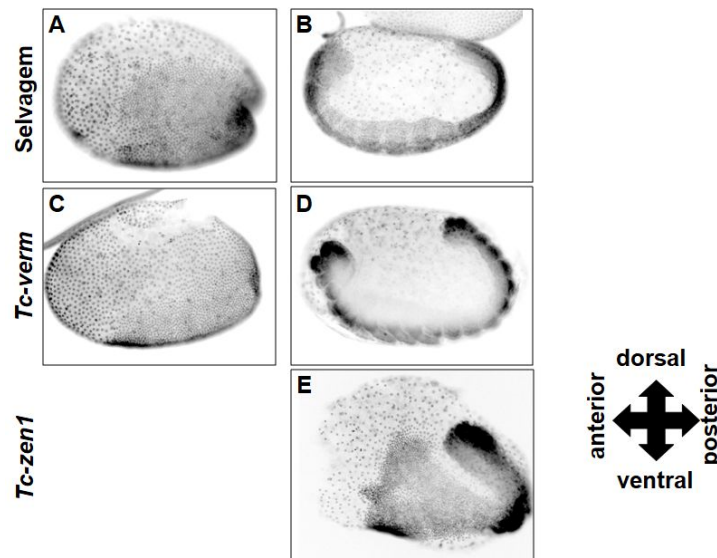
Um novo ensaio fisiológico foi realizado para avaliar o efeito do silenciamento gênico com essas novas dsRNAs em ovos expostos a diferentes umidades relativas (Figura 32). A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,15 µg por fêmeas. Os ovos selvagens e silenciados para *Tc-verm* mantiveram sua

viabilidade alta nas duas condições de UR. Mais uma vez o silenciamento de *Tc-zen1* apresentou baixa viabilidade independente da UR em que os ovos foram mantidos. Estes resultados foram similares aos obtidos a partir do uso do primeiro kit (T7 RiboMAX Express RNAi System) e diferem dos resultados descritos por Jacobs *et al.* (2013). Não houve diferença significativa entre as viabilidades segundo *Two-way* ANOVA.



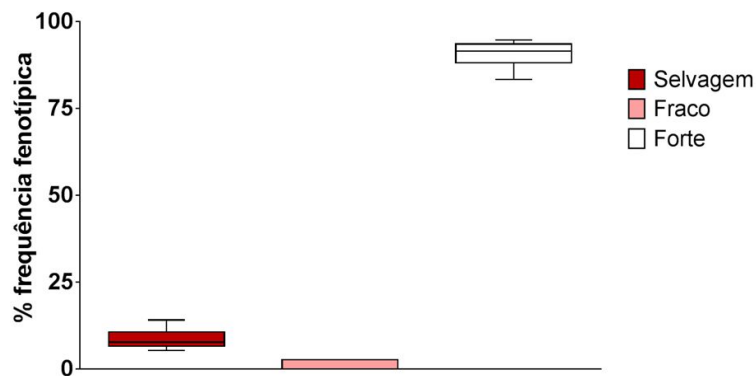
**Figura 32: Viabilidade de ovos selvagens e *pRNAi* para *Tc-verm* e *Tc-zen1*.** Fêmeas selvagens ou injetadas com 0,15 µg de dsRNA foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas cada. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufas a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 3 réplicas técnicas, obtidas entre 9 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui 96 ovos, por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa, de acordo com *Two-way* ANOVA.

O efeito do silenciamento foi novamente observado na morfologia dos embriões (Figura 33). Conforme visto acima (Figura 29) ovos dos grupos selvagem e RNAi para *Tc-verm* são normais tanto no estágio de gástrula inicial (Figura 33 A, C), quanto no estágio mais tardio, de extensão da banda germinal, em que o embrião está segmentado e com a cabeça bem definida (Figura 33 B, D). O embrião RNAi para *Tc-zen1* apresentou o seu fenótipo característico no estágio de extensão da banda germinal, embriões com cabeça grande/mal definida (Figura 33 E).



**Figura 33: Morfologia de ovos selvagens, pRNAi para *Tc-verm* e *Tc-zen1* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores indicam núcleo da serosa e os menores, núcleos do embrião. A e C: embriões no estágio inicial da gastrulação. A, D e E: embriões no estágio de extensão da banda germinal. A-D: todos os ovos apresentam aspecto normal. E: ovo silenciado para *Tc-zen1* com fenótipo característico. A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,15 µg por fêmea.

A frequência fenotípica da falta de *Tc-verm* confirmou o efetivo silenciamento desse gene (Figura 34). Ocorreram três fenótipos: selvagem (olho pigmentado) na frequência de 8,5%, silenciamento fraco (olho pouco pigmentado), frequência de 0,9% e silenciamento forte (olho sem pigmento) com frequência de 90,6%.

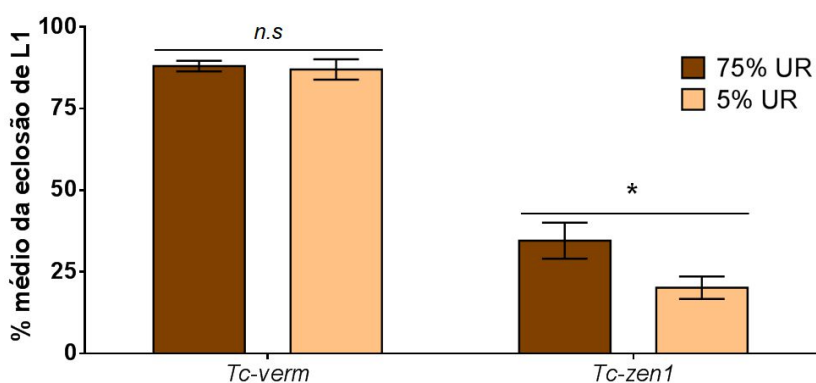


**Figura 34: Frequência fenotípica para o silenciamento de *Tc-verm*.** Os fenótipos selvagem e forte significam, respectivamente, presença e ausência de cor nos olhos. O boxplot representa a mediana, o primeiro quartil, o terceiro quartil e os limites inferior e superior das frequências fenotípicas de um único experimento com 6 réplicas técnicas de 96 ovos cada, obtidas entre 9 e 15 dias após a injeção de dsRNA.

Frente ao inesperado resultado para o silenciamento de *Tc-zen1*, em que houve baixa viabilidade em alta UR (Figuras 25 e 29) foi considerado que o

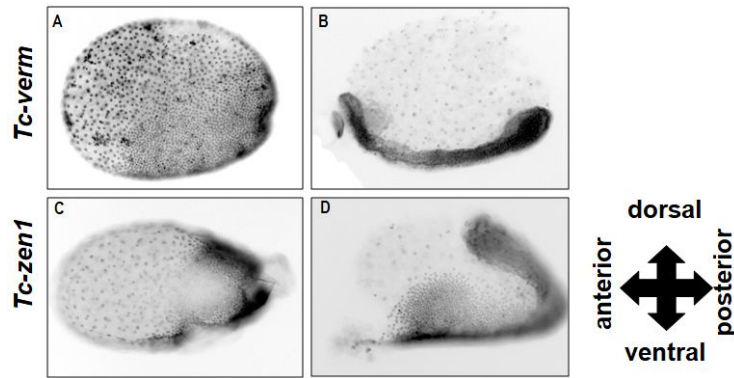
fenótipo observado estaria associado a uma possível infecção de fungo ou bactérias nos ovos, uma vez que a serosa tem papel importante para o sistema imune de ovos de *T. castaneum* (Jacobs e van der Zee, 2013). Uma nova série de silenciamento foi realizada em que as fêmeas injetadas para *Tc-zen1* foram mantidas em farinha de trigo, fluconazol e propionato de cálcio (vide metodologia).

Este ensaio foi realizado apenas com ovos pRNAi para *Tc-vern* e *Tc-zen1*. A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,15 µg por fêmea. O mesmo padrão de eclosão visto anteriormente foi observado (Figura 35, compare com Figuras 25 e 29). O silenciamento de *Tc-zen1* na cepa Geórgia acarretou em viabilidade com diferença significativa entre as duas URs (*Two-way* ANOVA). Ainda assim, foi confirmada a ocorrência do fenótipo letal nos embriões dessa cepa.



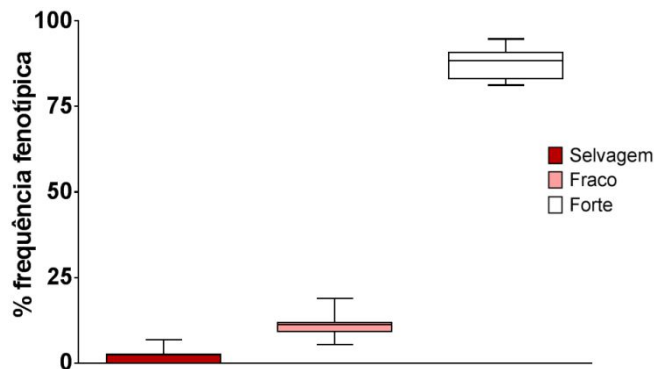
**Figura 35: Viabilidade de ovos selvagens e pRNAi para *Tc-vern* e *Tc-zen1*.** Fêmeas injetadas com 0,15 µg de dsRNA foram mantidas em misturas de farinha de trigo, fluconazol e propionato de cálcio a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 6 réplicas técnicas, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui 96 ovos, por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco representa  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way* ANOVA.

A marcação nuclear com DAPI confirmou o fenótipo característico para silenciamento de *Tc-zen1* (Figura 36 A e B) enquanto os ovos silenciados para *Tc-vern* possuem desenvolvimento normal (Figura 36 A e B), como descrito em análises anteriores.



**Figura 36: Morfologia de ovos pRNAi para *Tc-vern* e *Tc-zen1* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores indicam núcleos da serosa e os menores os do embrião. A-C: embriões no estágio inicial da gastrulação. B-D: embriões no estágio de extensão da banda germinal. A-B: Embriões com aspecto normal; C-D: Embriões com alterações no desenvolvimento. A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,15 µg por fêmea.

A frequência fenotípica do silenciamento de *Tc-vern* (ausência de cores nos olhos das larvas) foi avaliada (Figura 37). Três fenótipos foram observados, conforme observado anteriormente (Figura 34).



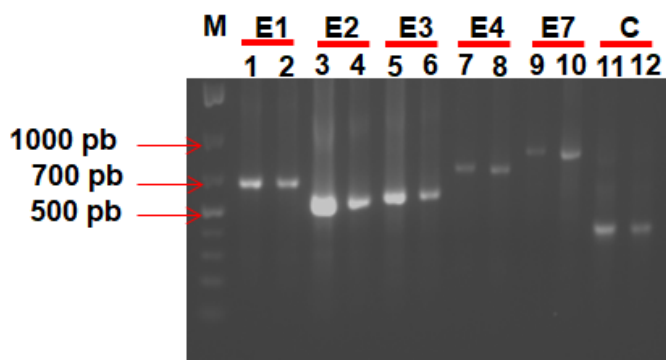
**Figura 37: Frequência fenotípica para o silenciamento de *Tc-vern*.** Os fenótipos selvagem e forte significam, respectivamente, presença e ausência de cor nos olhos. O boxplot representa a mediana, o primeiro quartil, o terceiro quartil e os limites inferior e superior de um único experimento com 12 réplicas técnicas de 96 ovos cada, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA.

#### 4.4.3. O silenciamento gênico grupal de *Tc-elov101-04* e seu efeito embrionário letal dependente da quantidade de dsRNA injetada

De acordo com os dados de Vargas (2015), as quatro elongases (*Tc-elov101* a *04*) são expressas apenas na serosa durante o período de formação da cutícula serosa. Por esse motivo, foi avaliado o efeito do silenciamento gênico dos quatro genes juntos. As dsRNA dos genes *Tc-elov101*, *Tc-elov102*, *Tc-elov103* e *Tc-elov104* foram sintetizadas com o kit Ambion® MEGAscript®



RNAi. O mesmo kit foi utilizado para sintetizar a dsRNA para o gene *Tc-elovl07* (controle negativo). As dsRNA apresentaram os tamanhos de banda esperados: *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03*, *Tc-elovl04*, *Tc-elovl07* e DNA controle com 585, 463, 519, 695, 581 e 500pb, respectivamente. (Figura 38).



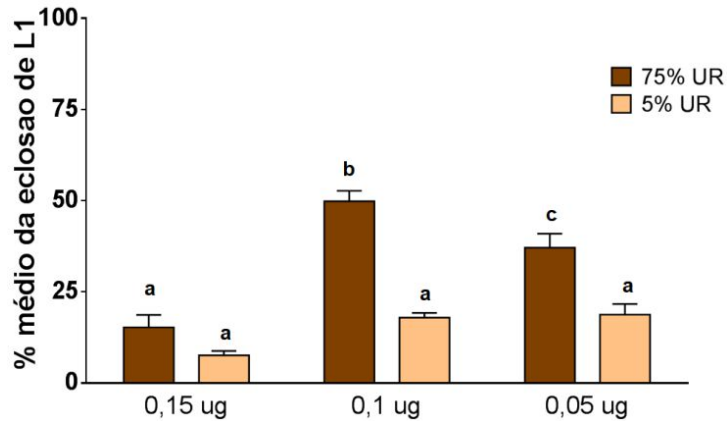
**Figura 38: dsRNAs sintetizadas para os genes *Tc-elovl* através de eletroforese em gel de agarose.** M: marcador de peso molecular. Genes *elovl* indicados pela abreviação (e.g. *Tc-elovl01* = E1) C: DNA controle. Números pares e ímpares indicam a primeira e segunda eluição, respectivamente, oriundas de etapa final do protocolo de síntese.

Três experimentos independentes foram realizados para avaliar o efeito do silenciamento grupal das quatro *elovl* frente à viabilidade dos ovos nas condições de 75 e 5% UR (Figura 39). No primeiro experimento de silenciamento, a quantidade total de dsRNA injetada foi de 0,15 µg por fêmea (ou seja, ~0,038 µg de dsRNA de cada uma das quatro *elovl*). No segundo e terceiro experimentos, a quantidade total de dsRNA injetada foi de 0,1 e 0,05 µg por fêmea, respectivamente. Com a quantidade de 0,15 µg de dsRNA o silenciamento grupal das *Tc-elovl 01* a *04* acarretou na eclosão de 15,3 e 7,6% das larvas em 75 e 5% UR, respectivamente. Estes valores não apresentaram diferença significativa, o que mostrou um efeito letal durante o desenvolvimento embrionário que independe da variação de umidade relativa (Figura 39).

Quando a quantidade de dsRNA injetada cai para 0,1 µg, ocorreu um aumento da viabilidade dos ovos com diferença significativa em relação a 75 e 5% UR (*Two-way* ANOVA). Quando a quantidade de dsRNA cai ainda mais para 0,05 µg, o padrão de viabilidade se repete: ambas as UR apresentaram baixa viabilidade mas a com 5% UR é significativamente menor.

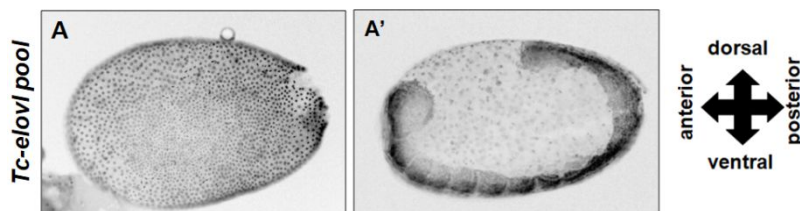
O teste de comparação múltipla *Two-way* ANOVA apresentou diferença significativa ao se comparar os valores de eclosão de larvas a 75% UR dentro das três quantidades de dsRNA injetadas. Mas isso não ocorre quando

comparamos a viabilidade de ovos mantidos a 5% UR. Esses três experimentos apresentaram como controles, realizados em paralelo, ovos selvagens ou silenciados para *Tc-verm* ou *Tc-elovl07*, apresentados previamente (Figuras 29, 32 e 41). Em todos os casos esses controles apresentaram elevada viabilidade em ambas as URs.



**Figura 39: Efeito de diferentes quantidades de dsRNA no silenciamento quadruplo para os genes *Tc-elovl 01*, *Tc-elovl 02*, *Tc-elovl 03* e *Tc-elovl 04*.** Fêmeas injetadas com dsRNA foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposição diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufas a 35 °C em condição de 75 e 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 5 ou 6 réplicas técnicas, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de cada quantidade de dsRNA. Cada réplica possui 96 ovos, por condição de UR. Cada letra representa a diferença significativa de acordo com *Two-way* ANOVA ( $P < 0,0001$ ).

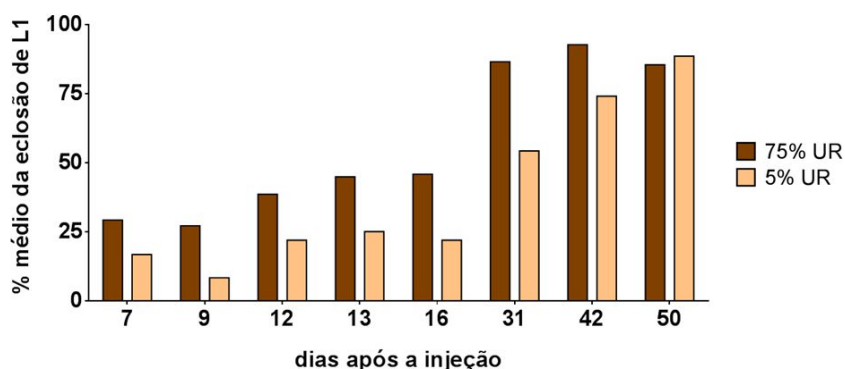
O silenciamento grupal para *Tc-elovl* de 01 a 04 não afetou a morfologia inicial dos embriões, que apresentaram perfil similar aos grupos de ovos selvagens (Figura 40).



**Figura 40: Morfologia de ovos *pRNAi* para *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. A: embrião no estágio inicial de blastoderma indiferenciado. A': embrião no estágio de extensão da banda germinal. Ambos os embriões apresentam aspecto normal.

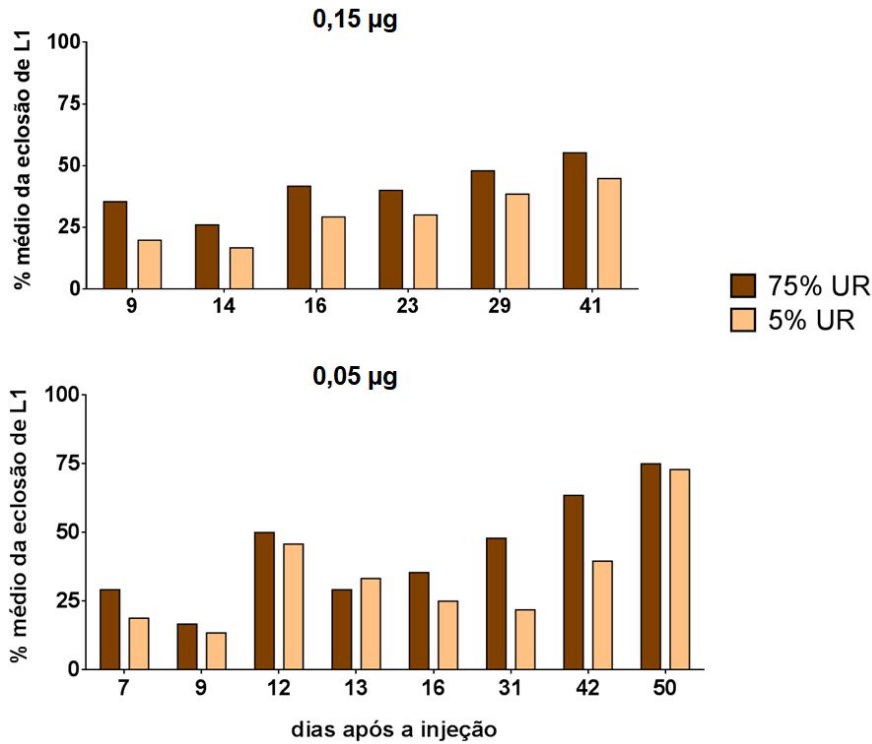
#### 4.4.4. O silenciamento gênico na cepa *Georgia* de *T. castaneum dura* por até 41 dias

O silenciamento gênico realizado em conjunto para *Tc-elovl01-04* (Figura 41) manteve seu fenótipo com baixa viabilidade até 16 dias após a injeção, independente da condição de UR. A partir de 30 dias após o silenciamento, o percentual de eclosão de larvas se eleva nas duas condições, sendo mais proeminente no grupo de ovos mantidos a 75% UR. Quarenta e dois dias após a injeção, não observamos o fenótipo letal na eclosão das larvas o que mostra o fim do silenciamento gênico para este grupo de genes.



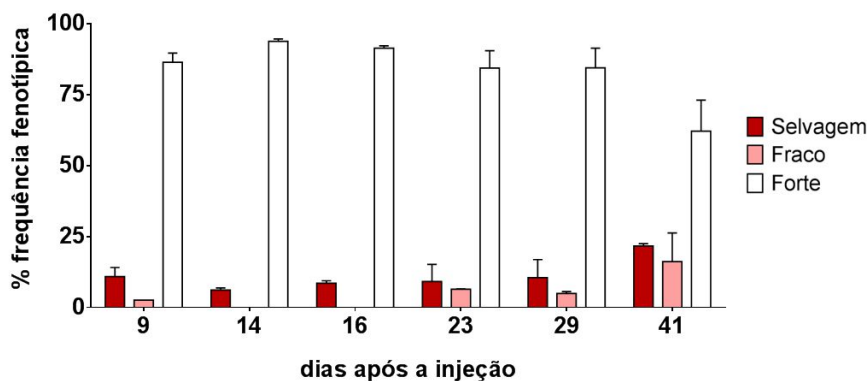
**Figura 41: Duração do fenótipo do silenciamento conjunto para *Tc-elovl 01*, *Tc-elovl 02*, *Tc-elovl 03*, *Tc-elovl 04*.** Fêmeas injetadas com 0,05 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30 °C e 80% umidade relativa UR realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufas a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual de eclosão de um experimento com uma réplica técnica de 96 ovos, por condição de UR.

Já para o gene *Tc-zen1*, em ovos oriundos de fêmeas injetadas com 0,15 µg de dsRNA o fenótipo letal de silenciamento manteve-se por até 41 dias após a injeção de dsRNA. Quando a quantidade de dsRNA foi reduzida para 0,05 µg o mesmo padrão de duração de fenótipo foi observado: até 42 dias após a injeção. Após 50 dias de injeção, a letalidade já não é observada (Figura 42).



**Figura 42: Duração do fenótipo letal do silenciamento para *Tc-zen1*.** Fêmeas injetadas com 0,15 ou 0,05 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30° C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufas a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual de eclosão. Foi realizado apenas um experimento para cada quantidade de dsRNA injetada. Cada coluna representa uma réplica técnica de 96 ovos, por UR. Para cada experimento foi utilizados um total de 768 ovos, por condição de UR.

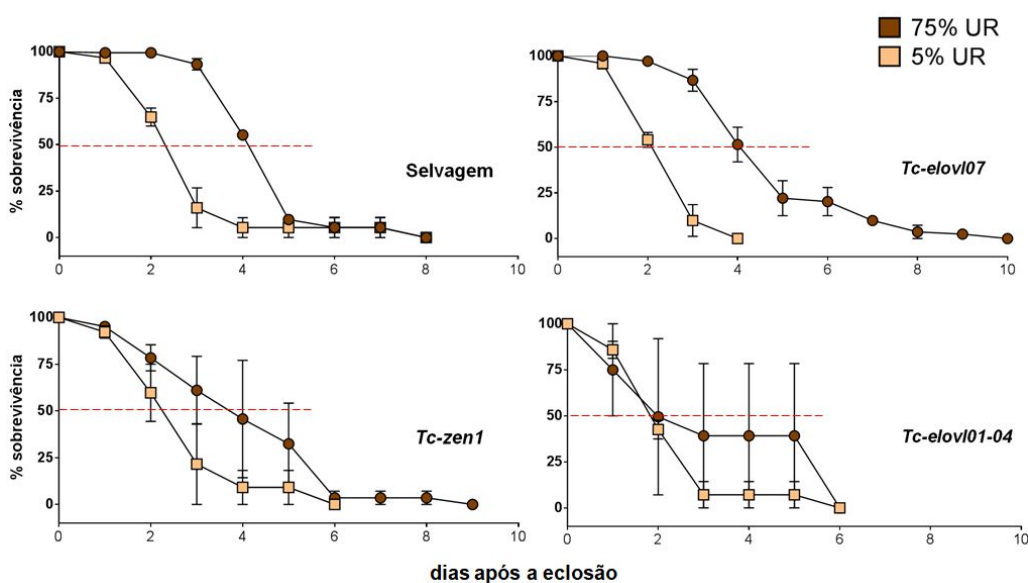
De forma semelhante, a durabilidade do fenótipo de silenciamento para *Tc-vern* também foi observado por até 41 dias (Figura 43).



**Figura 43: Duração da frequência fenotípica para o silenciamento de *Tc-vern*.** Fêmeas injetadas com 0,15 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30° C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. O fenótipo selvagem e forte significam, respectivamente, presença e ausência de cor nos olhos. É representado o percentual médio e o erro-padrão do fenótipo de um experimento com duas réplicas técnicas de 96 ovos por dia avaliado.

#### 4.4.5. O silenciamento gênico em conjunto para *Tc-elov1* afeta a sobrevivência das larvas após a eclosão

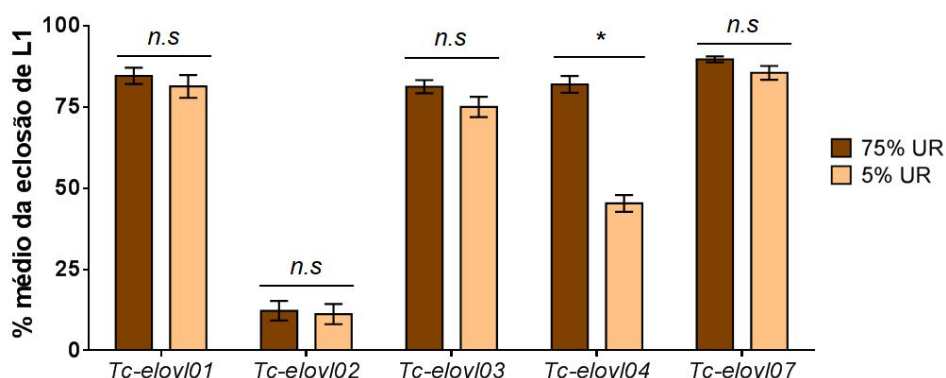
A viabilidade das larvas eclodidas dos ovos selvagens e ovos RNAi para *Tc-elov107*, *Tc-zen1* e RNAi grupal para *Tc-elov1* foram acompanhadas por 10 dias nas duas condições de UR testadas (**Figura 44**). Tal acompanhamento teve o intuito de avaliar o efeito dos silenciamentos na sobrevivência larval. Para três grupos analisados, selvagem, *Tc-elov107* silenciado e *Tc-zen1* silenciado, foram observados padrões similares. A taxa de mortalidade atinge 50% das larvas com cerca de dois e quatro dias após a eclosão, em grupos de larvas mantidas a 5 e 75% UR, respectivamente. Já no silenciamento em conjunto para *Tc-elov1*, observamos 50% da mortalidade de larvas após dois dias de eclosão tanto em grupo de larvas mantidas a 5% quanto em 75% UR. Ainda que tenha havido uma grande variância dentre as amostras do grupo *Tc-elov1*, este resultado nos aponta para um possível efeito do silenciamento gênico na sobrevivência das larvas.



**Figura 44: Percentual da sobrevivência das larvas oriundas de ovos selvagens e silenciados para *Tc-elov107*, *Tc-zen1* e o grupo de *Tc-elov1 01 a 04*.** Grupos de larvas recém-eclodidas foram mantidas a 35 °C em 75 ou 5% de umidade relativa (mesma condição experimental em que os ovos foram mantidos). Cada ponto representa o percentual médio e o erro padrão da sobrevivência das larvas de um único experimento com duas réplicas experimentais. Os ovos observados foram oriundos de coletas realizadas com 7 e 10 dias após a injeção de dsRNA. Foram avaliados por condição de UR um total de 401 larvas para selvagem; 338 larvas para *Tc-elov107*; 138 larvas para *Tc-zen1*; e 102 larvas para grupo de *Tc-elov1 01 a 04*. A linha pontilhada em vermelho indica o ponto de 50% de mortalidade das larvas.

#### 4.4.6. O gene *Tc-elovl04* é importante para proteger ovos de *T. castaneum* em condição de baixa umidade

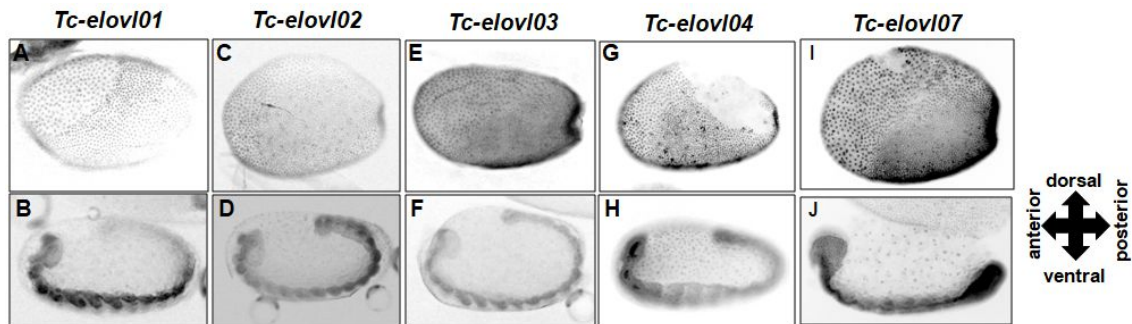
Visto os resultados iniciais obtidos para o silenciamento grupal das quatro *Tc-elovls*, optou-se por realizar o silenciamento gênico de cada elongase em separado (Figura 45). A quantidade de dsRNA injetado foi de 0,026 µg por fêmea. O silenciamento para *Tc-elovl01* e *Tc-elovl03* não afetou a viabilidade dos ovos, em qualquer UR. O mesmo perfil é visto para o silenciamento de *Tc-elovl07*, gene não expresso na embriogênese de *T. castaneum* que serviu como controle negativo (Vargas, 2015). O silenciamento de *Tc-elovl02* acarretou em baixa viabilidade dos ovos em qualquer UR, mostrando efeito letal na embriogênese que é independente da UR. Por outro lado, o silenciamento de *Tc-elovl04* mostrou clara diferença na viabilidade dos ovos mantidos em 75 e 5% UR, com viabilidades de 82 e 45,3%, respectivamente (Figura 45).



**Figura 45: Efeito dos silenciamentos individuais dos genes *elovl* na viabilidade dos ovos de *T. castaneum*.** Fêmeas injetadas com 0,03 µg de cada um dos dsRNAs foram mantidas em estufa a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão de dois a quatro experimentos independentes. Cada experimento consistiu de 1 a 6 réplicas técnicas de 24 a 96 ovos cada por condição de UR, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Foram avaliados, por condição de UR, um total de 816, 864, 848, 1184 e 864 ovos para *Tc-elovl01*, *Tc-elovl02*, *Tc-elovl03*, *Tc-elovl04* e *Tc-elovl07*, respectivamente. n.s.: diferença não significativa; asterisco indica  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way* ANOVA.

A morfologia dos embriões foi avaliada em grupos de ovos silenciados para os genes *Tc-elovl*. O silenciamentos para *Tc-elovl01* a *07* apresentaram padrão normal durante os períodos de embriogênese avaliados. Tanto as células da serosa quanto às do embrião são claramente definidas. No estágio

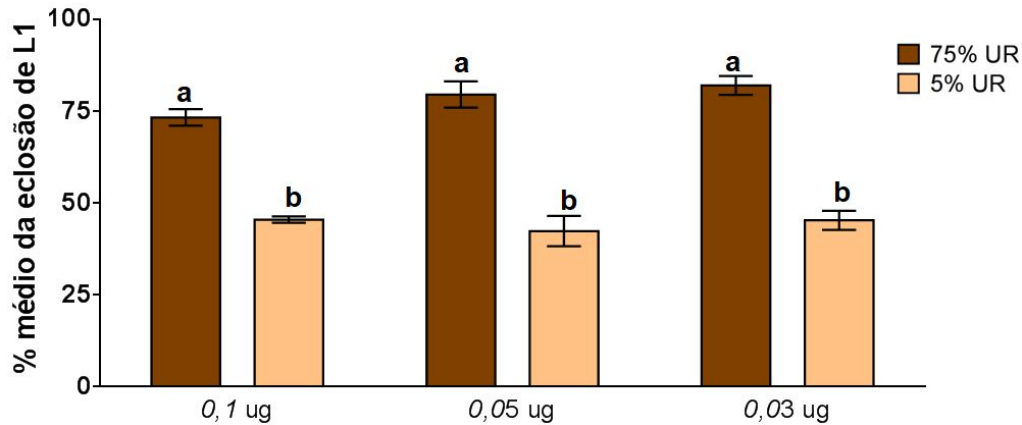
inicial de gastrulação, observamos o embrião bem segmentado como é observado em ovos selvagens (Figura 46).



**Figura 46: Morfologia de ovos oriundos do silenciamento individual para *Tc-elov101*, *Tc-elov102*, *Tc-elov103*, *Tc-elov104* ou *Tc-elov107* de *T. castaneum*.** Ovos com idade entre 0 e 24 horas foram fixados e marcados com DAPI. Cada ponto preto é um núcleo celular. Os pontos maiores indicam os núcleos da serosa e menores, do embrião. Painéis superiores: embriões no estágio inicial da gastrulação. Painéis inferiores: embriões no estágio de extensão da banda germinal. Todos os embriões apresentam aspecto normal.

#### **4.4.7. O efeito do silenciamento de *Tc-elov104* não é alterado frente à variação da quantidade de dsRNA**

Foi avaliado o efeito da variação na quantidade de dsRNA de *Tc-elov104* na viabilidade dos ovos, com as seguintes quantidades de dsRNA: 0,1, 0,05 e 0,03  $\mu\text{g}$  (Figura 47). Em todos os casos, os efeitos foram os mesmos, e o aumento da quantidade de dsRNA não aumentou o efeito no fenótipo (*Two-way* ANOVA).

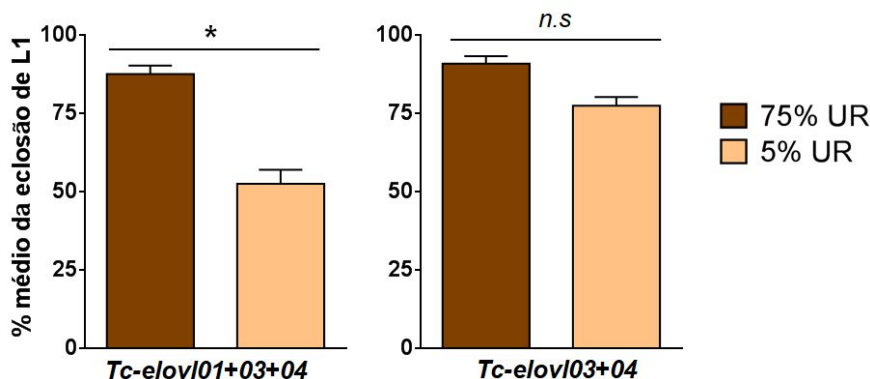


**Figura 47: Efeito de diferentes quantidades de dsRNA para *Tc-elovl04* na viabilidade dos ovos de *T. castaneum*.** As quantidades de dsRNA injetadas estão indicadas abaixo das colunas. Fêmeas injetadas foram mantidas em estufas a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35 °C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão de 1 a 4 experimentos independentes. Cada experimento consistiu de 1 a 6 réplicas técnicas de 24 a 96 ovos cada por condição de UR, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Foi avaliado por condição de UR um total de 288, 576 e 1184 ovos para as quantidades de 0,1, 0,05 e 0,03 µg de dsRNA, respectivamente. As letras representam diferenças significativas (*Two-way ANOVA*,  $P < 0,0001$ ).

#### **4.4.8. O silenciamento gênico grupal de *Tc-elovl01*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* afeta viabilidade em baixa umidade relativa**

Foi realizado o silenciamento em conjunto de *Tc-elovl01*, *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* com intuito de avaliar uma possível interação entre estes três genes. Além disso, foi silenciado em conjunto os genes *Tc-elovl03* e *Tc-elovl04* (Figura 48). A viabilidade dos ovos manteve-se alta quando mantidos a 75% UR. Contudo, no silenciamento triplo a viabilidade dos ovos foi afetada em 5%UR, com diferença estatística entre os dois grupos. Já no silenciamento duplo não houve efeito sobre as diferentes UR.





**Figura 48: Efeito do silenciamento triplo para *Tc-elov101*, *Tc-elov103* e *Tc-elov104* e silenciamento duplo para *Tc-elov103* e *Tc-elov104* na viabilidade dos ovos de *T. castaneum*.** A quantidade de dsRNA injetada foi de 0,03 µg por fêmea. Fêmeas injetadas com 0,03 µg de dsRNA foram mantidas em estufa a 30 °C e 80% umidade relativa (UR) realizando oviposições diárias de 24 horas. Grupos de ovos obtidos (com idade entre 0 e 24 horas) foram mantidos em estufa a 35°C em condição de 75 ou 5% UR. A viabilidade foi avaliada pela eclosão ocorrida entre 2 e 3 dias após transferência para as câmaras de UR. É representado o percentual médio e o erro-padrão da eclosão obtidas de um experimento com 2 a 5 réplicas técnicas, obtidas entre 7 e 15 dias após a injeção de dsRNA. Cada réplica possui de 59 a 96 ovos por condição de UR. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco representa a diferença significativa com  $P < 0,0001$ , ambos de acordo com *Two-way ANOVA*.

#### 4.4.9. Confirmação do silenciamento gênico de *Tc-elov104* através de RT-PCR

Para confirmar o silenciamento de *Tc-elov104* foram realizadas RT-PCRs a partir de material genético obtido de ovos controle e silenciados para *Tc-elov104* com 0-6 horas após oviposição (HAO) e 8-18 HAO, que correspondem aos períodos antes e durante a formação da cutícula serosa (Figura 26). Além de avaliar a expressão de *Tc-elov104*, também foram avaliadas a expressão das outras 17 *elov1s* presentes no genoma de *T. castaneum*, a fim de conferir a possível interferência do silenciamento direcionado para *Tc-elov104* na expressão de outras elongases (*i.e.* efeito *off target*) (Figura 49).

Os genes *Tc-elov101* a *Tc-elov104* são expressos entre 8-18 HAO, confirmando predições de bioinformática (Vargas, 2015). Além deles, outros dois genes foram detectados como sendo expressos na embriogênese inicial: *Tc-elov105* e *Tc-elov106*. Os demais genes, *Tc-elov107* a *Tc-elov117* não são expressos nos estágios iniciais da embriogênese. O gene *Tc-elov118* foi amplificado, contudo este gene apresenta uma peculiaridade, uma vez que o mesmo apresenta apenas um éxon.

O DNA genômico foi amplificado mostrando a eficiência dos *primers*, exceto para os genes *Tc-elov110* e *Tc-elov113*. O mesmo ocorreu com o gene

Tc-*elovl02* que devido ao tamanho do amplicon, 7727 pb, não amplificou o DNAg. O RT-PCR realizado aponta que a expressão do gene *Tc-elovl04* foi parcialmente reduzida com 8-18 HAO. A expressão das outras 17 *Tc-elovl* não foi alterada com 0-6HAO e 8-18 HAO.

Ovos selvagens

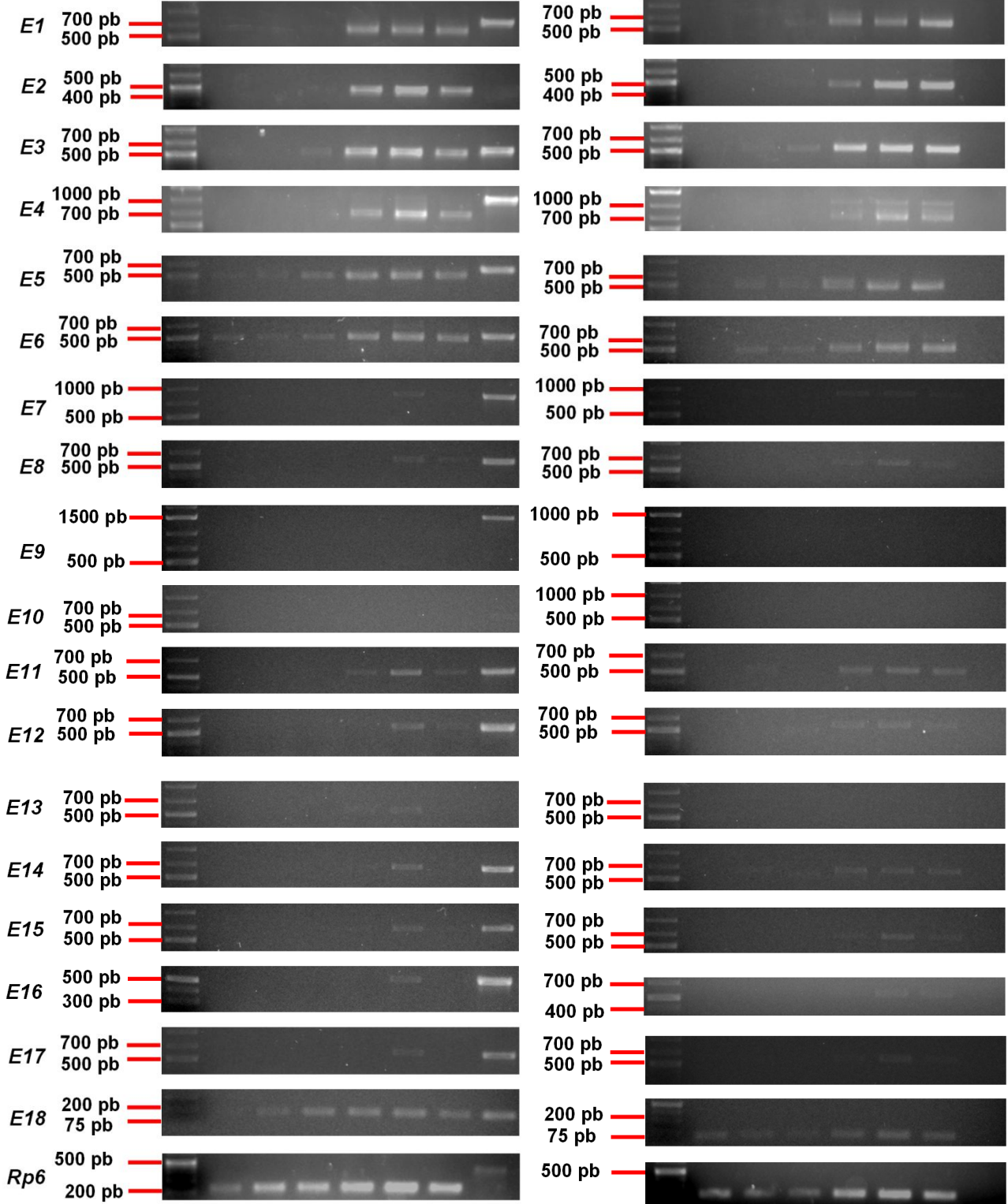
Ovos *Tc-elov104* RNAi

0-6 HAO      8-18 HAO

0-6 HAO      8-18 HAO

MM I II III I II III g

MM I II III I II III N



**Figura 49: Expressão gênica das 18 *Tc-elovls* em ovos.** Foi realizada RT-PCR com cDNAs obtidos de ovos selvagens e silenciados para *Tc-elovl04* com 0-6 HAO e 8-18 HAO. Algarismos romanos indicam as três réplicas biológicas independentes. Controle positivo: PCR com DNA genômico (g). Controle negativo: PCR sem DNA (N, de *non template control*) Todos os genes amplificaram no tamanho de banda esperado de acordo com a Tabela 4

**Tabela 4: Tamanho esperados dos amplicons, após RT-PCR**

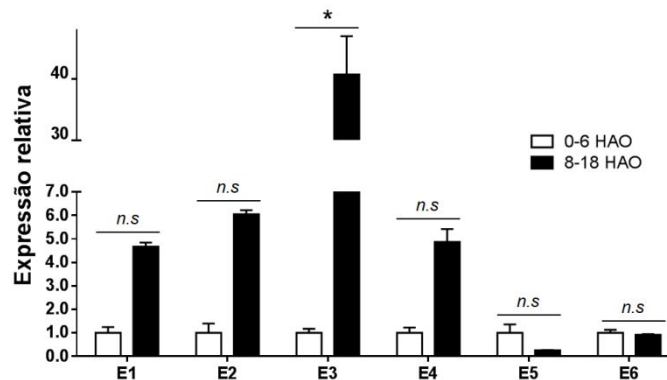
Gene	cDNA (pb)*	DNAg (pb)*
<i>Tc-elovl01</i>	585	751
<i>Tc-elovl02</i>	463	7.727
<i>Tc-elovl03</i>	519	618
<i>Tc-elovl04</i>	695	1091
<i>Tc-elovl05</i>	492	572
<i>Tc-elovl06</i>	497	529
<i>Tc-elovl07</i>	581	852
<i>Tc-elovl08</i>	497	572
<i>Tc-elovl09</i>	505	1.537
<i>Tc-elovl10</i>	512	841
<i>Tc-elovl11</i>	499	536
<i>Tc-elovl12</i>	442	514
<i>Tc-elovl13</i>	506	648
<i>Tc-elovl14</i>	540	613
<i>Tc-elovl15</i>	506	634
<i>Tc-elovl16</i>	326	500
<i>Tc-elovl17</i>	470	557
<i>Tc-elovl18</i>	165	165
<i>Tc-Rps6</i>	224	410

\* a diferença entre o tamanho de amplicon obtido com cDNA e DNAg ocorre devida à presença de intron, dentro das regiões em que os primers foram desenhados. A única exceção é *Tc-elovl18*, que não possui intron.

#### 4.4.10. Verificação do silenciamento gênico de *Tc-elovls* através de RT-qPCR

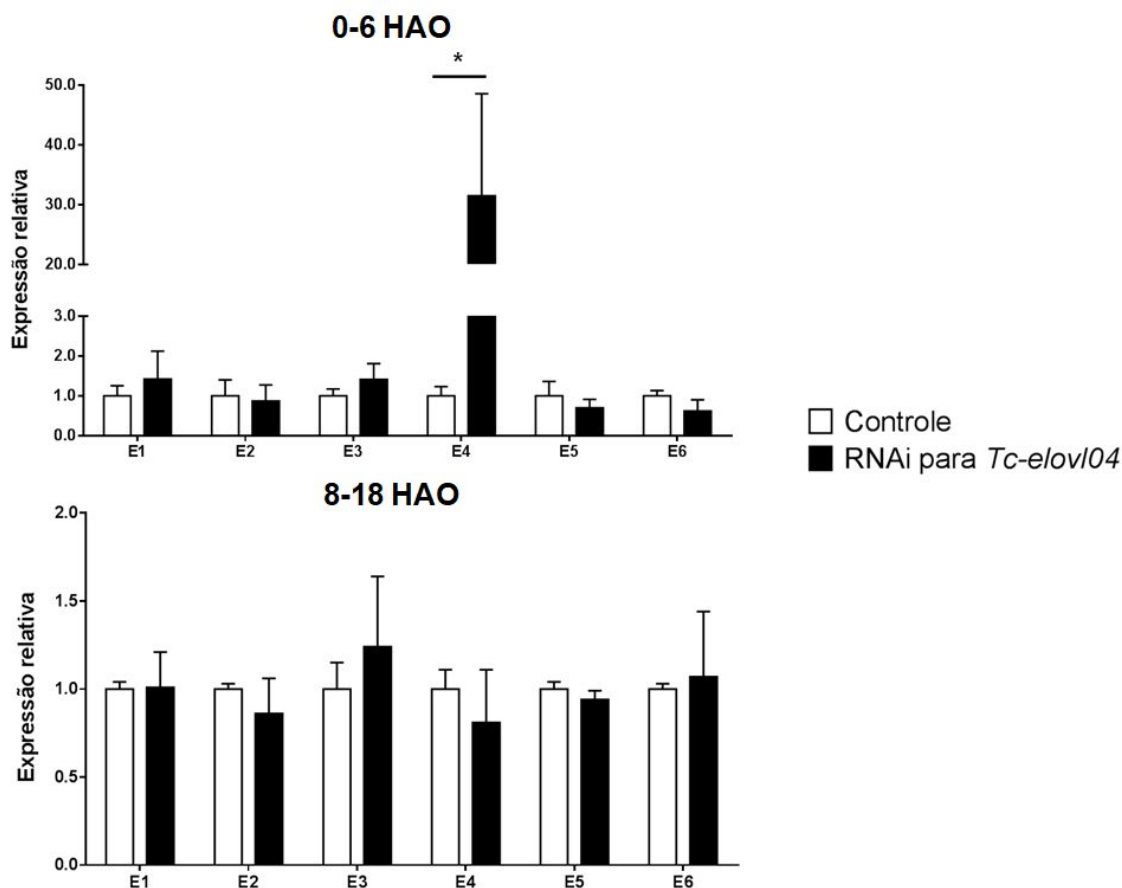
A partir dos resultados obtidos com RT-PCR, as expressões quantitativas dos genes *Tc-elovl01* a *06* foram avaliadas por PCR em tempo real. Avaliamos primeiro a diferença no padrão de expressão de ovos selvagens com 0-6 HAO e 8-18 HAO (Figura 50). Os genes *Tc-elovl01*, *02*, *03*

e 04 apresentaram um aumento, que não foi significativo, nas suas expressões, entre 0-6 e 8-18 HAO. Uma diferença significativa no aumento da expressão ocorreu apenas para o gene *Tc-elov103* (*Two-way ANOVA*). Os genes *Tc-elov105* e *06* apresentam o mesmo nível de expressão entre os períodos de 0-6 e 8-18 HAO.



**Figura 50: Expressão relativa dos genes *Tc-elov1* por PCR em tempo real em grupos de ovos selvagens com 0-6 e 8-18 HAO.** Os dados foram normalizados pelo grupo de 0-6 HAO. As barras representam a média e o erro padrão de três experimentos distintos. *n.s.*: diferença não significativa; asterisco: diferença significativa, ambos de acordo com *Two-way ANOVA* ( $P < 0,0001$ ).

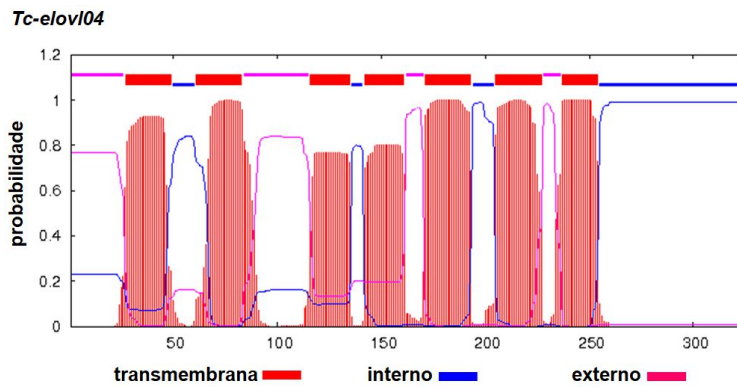
Em seguida avaliamos o padrão de expressão dos genes *Tc-elov101* a *06* em amostras de ovos selvagens e silenciados para *Tc-elov104* com idades de 0-6 HAO ou 8-18 HAO (Figura 51). Observamos que a expressão dos genes em ovos controle de 0-6 HAO não difere dos ovos silenciados para *Tc-elov104* na mesma faixa temporal, o que mostra que o silenciamento de *Tc-elov104* não afeta na expressão de outros genes *elov1*. Um dado interessante e inesperado foi a elevada expressão de *Tc-elov104* em ovos silenciados para o *Tc-elov104*. Este resultado foi ocasionado, provavelmente, pela amplificação da dupla-fita que foi injetada no corpo da fêmea e que foram transferidas para os ovos. As análises estatísticas realizadas com grupos de ovos 8-18 HAO, demonstrou que não há diferença na expressão gênica entre os grupos controle e silenciados para *Tc-elov104*. Contudo, observamos uma tendência de redução na expressão de *Tc-elov104* em material silenciado com 8-18 HAO.



**Figura 51: Expressão relativa dos genes *Tc-elov1* por RT-qPCR em ovos controle e silenciados para *Tc-elov104*.** O cDNA controle é oriundo de ovos selvagens. Dois padrões temporais foram analisados: 0-6 horas após a oviposição (HAO) e 8-18 HAO. As barras representam a média e o erro padrão de três experimentos distintos. O asterisco representa a diferença significativa de acordo com *Two-way ANOVA*.  $P < 0,0001$ .

#### **4.4.11. Caracterização da sequência proteica de *Tc-ELOVL04***

A predição da estrutura proteica da ELOVL04 de *T. castaneum* evidência que essa proteína apresenta sete regiões transmembranares (nos aminoácidos 27-49, 61-83, 116-135, 142-161, 171-193, 205-227 e 237-254) (Figura 52). As predições apontam ainda que essa proteína estaria localizada no retículo endoplasmático. Seu ponto isoelétrico é de 9,38, seu peso molecular predito é de 38,71 kDa, com 325 resíduos de aminoácidos.



**Figura 52: Predição de hélices transmembranas da proteína Tc-ELOVL04.** O eixo horizontal indica a numeração de resíduos de aminoácidos da proteína. O eixo vertical indica a probabilidade de ocorrência de hélices transmembrana e de regiões hidrofílicas. As porções em vermelho representam as prováveis regiões transmembranares da proteína. Porções em azul e rosa representam respectivamente as prováveis regiões hidrofílicas, da parte interna e externa da proteína.

## 4.5. DISCUSSÃO

Os três grandes grupos de seres multicelulares que colonizaram o meio terrestre foram as plantas, os hexápodes (com destaque para os insetos) e os vertebrados. Esses três grupos desenvolveram estratégia semelhante para a proteção contra a perda de água: a produção de uma barreira hidrofóbica rica em lipídeos de cadeia longa ou seus derivados (Hadley, 1980). No caso das plantas, a barreira hidrofóbica de folhas e frutos é a cutícula, constituída por uma cutina e uma camada de cera, cujos principais componentes são derivados de AG de cadeia muito longa (incluindo alcanos e aldeídos); além de álcoois, cetonas e ésteres (Yeats e Rose, 2013). Em vertebrados, o tegumento é composto por células epidermais e um estrato córneo que é rico de derivados de AG de cadeia muito longa como fosfolipídeos e ceramidas (Lillywhite, 2006). E no caso dos hexápodes (como já relatado no item 1.2.1) o tegumento de adultos e formas imaturas contém hidrocarbonetos de cadeia longa, álcoois e ésteres de ácidos graxos (Brusca e Brusca, 2003; Chapman *et al.*, 2013). Apesar de compreendermos bem a estrutura e a composição das mesmas que atuam na proteção contra perda de água nas fases adultas e larvais de hexápodes, há lacunas sobre a composição das cascas dos ovos de hexápodes.

### 4.5.1. A formação da cutícula serosa de *T. castaneum*

Como descrito anteriormente, os ovos de hexápodes apresentam como estruturas protetoras camadas de origem materna (generalizada como córion) e de origem pós-zigótica - cutícula serosa (em insetos) e cutícula blastodermal (em hexápodes não insetos) (Rezende *et al.*, 2016). Apesar de ser uma estrutura já conhecida no besouro *T. castaneum* (Jacobs *et al.*, 2013), o período exato de formação da cutícula serosa não era conhecido. Aqui, foi mostrado que essa cutícula em *T. castaneum* é sintetizada ainda no primeiro terço da embriogênese, com aproximadamente 16% do desenvolvimento embrionário total. Período em que o embrião encontra-se no estágio de extensão/retração da banda germinal (Strobl e Stelzer, 2014).

Os dados obtidos para o besouro *T. castaneum* corroboram com as descrições feitas para outros insetos. Dentre os mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis*, *An. quadrimaculatus* e *Culex quinquefasciatus*, a cutícula



serosa é formada no primeiro terço da embriogênese, entre 18-29% do desenvolvimento, nos estágios de fim da extensão da banda germinal/ início da retração da banda germinal (Farnesi *et al.*, 2017; Rezende *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2014). Na espécie *Locusta migratoria* (Orthoptera) a cutícula serosa é secretada com 27% do desenvolvimento embrionário (Lagueux *et al.*, 1979). Para a Lepidoptera *Manduca sexta*, é descrito a formação de duas cutículas serosa. A primeira é formada com 15% do desenvolvimento embrionário; já a segunda camada é depositada com aproximadamente 20% da embriogênese (Dorn *et al.*, 1987). Esses dados evidenciam que o estágio de formação da cutícula serosa, em insetos, é conservado entre diferentes espécies.

#### **4.5.2. A concentração e o tamanho de dsRNA injetada em *T. castaneum***

O processo de RNAi é um fenômeno natural que consiste no silenciamento gênico pós-transcricional e que pode ser utilizado artificialmente para definir o papel de genes em processos biológicos fundamentais. Este processo e sua aplicabilidade como ferramenta de investigação foi descrita pela primeira vez, ainda que com um nome diferente, na década de 90, em estudo realizado com petúnias (Napoli *et al.* 1990). Os pesquisadores buscavam aumentar a expressão da enzima calcona sintase (CHS, *chalcone synthase*), a partir da adição de cópias do gene endógeno. O aumento da expressão de CHS intensificaria a coloração das flores. Contudo, observou-se um fenótipo inesperado: algumas plantas apresentaram flores totalmente brancas ou com padrão duplo de coloração (violeta e branco) (Napoli *et al.*, 1990). Subsequentemente, Fire e colaboradores (1998) descreveram como a expressão gênica é afetada pela ação de moléculas de dsRNA homólogas ao gene no nematóide *Caenorhabditis elegans*. Tal efeito não era observado quando a dsRNA era homóloga ao regiões promotoras ou íntrons e logo seria necessário a transcrição do gene para o fenótipo de silenciamento ser observado.

Desde então, RNAi é empregada em diversas áreas, desde terapia médica ao manejo de pragas (Maia, 2013; Nunes e Simões, 2013; Pereira e Lopes-Cendes, 2013). Diferentes abordagens podem ser utilizadas para desencadear o processo de silenciamento como: RNA dupla-fita (dsRNA do Inglês, *double-stranded RNA*), RNA de interferência longo em forma de grampo

(hpRNA; *hairpin* RNA), pequeno RNA de interferência (siRNA, *short interfering* RNA), pequenos RNAs de interferência preparado por endonuclease (esiRNA; *endonuclease-prepared small interfering* RNAs), RNA de interferência pequeno em forma de grampo (shRNA; *short hairpin* RNA), entre outros (Pereira, 2013). Neste trabalho, usamos a molécula de dsRNA para obter o silenciamento gênico.

A eficiência do silenciamento por RNAi desencadeado por dsRNA é dependente de vários fatores, sendo o tamanho do dsRNA e a sua concentração alguns dos mais importantes. Para obter um fenótipo eficiente o tamanho da dupla-fita varia entre 300-800 pares de base (pb) (Pereira, 2013). Moléculas de dsRNA maiores de 800 pb podem favorecer o silenciamento cruzado (*off-targeting*) (Linz *et al.*, 2014; Pereira, 2013) e, em células de mamíferos, dsRNAs longas acarreta na morte celular (Alexopoulou *et al.*, 2001; Klahre *et al.*, 2002). Contudo, isto varia entre os organismos. Em plantas, por exemplo, o uso de dsRNA longas (~1000 pb) apresenta elevada eficiência. No caso do besouro *T. castaneum*, a comunidade científica descreve que o tamanho ideal da dsRNA varia entre 150 a 500 pb (Linz *et al.*, 2014).

Miller *et al.* (2012), em trabalho realizado com larvas de *T. castaneum*, mostrou que moléculas de dsRNA com 69 pb são capazes de gerar o fenótipo de silenciamento eficiente, similar as dsRNAs com 520 pb. Os autores relatam que de acordo com o estágio de vida e da complexidade do organismo, é possível obter fenótipo de silenciamento com dsRNAs menores. Foi visto efeito de silenciamento gênico ao injetarem moléculas de dsRNA com 30 pb em ovos de *T. castaneum* em estágio de blastoderma sincicial (quando não há membranas ao redor dos núcleos). As larvas eclodidas destes ovos apresentaram fenótipo silenciado satisfatório. No presente trabalho, os tamanhos de dupla-fitas de RNA injetadas nas fêmeas são de tamanhos compatíveis com os que são descritos na literatura, entre 463 e 695 pb (vide item 4.3.5).

Para *T. castaneum*, descreve-se que a concentração ideal de dsRNA é 1 µg/µl. Contudo, quanto maior a concentração injetada, maior o fenótipo observado (Aranda *et al.*, 2008; Linz *et al.*, 2014). Miller *et al.* (2012) avaliou a eficiência do silenciamento em larvas de *T. castaneum* através de diluições seriadas de dsRNA. Para dsRNA com 520 pb, observou-se que o fenótipo de

silenciamento é obtido mesmo quando a concentração cai de 1 µg/µl para 0,0001 µg/µl (diluição de 10000x). No caso de dsRNA curtas, com 69 pb, o fenótipo foi observado com dsRNA diluída até 1.000 vezes (0,001 µg/µl). Neste trabalho, padronizamos a quantidade de dsRNA injetada nas fêmeas. Os valores de dsRNA variaram entre 0,15 até 0,03 µg (o que equivale a faixa de 0,72 - 0,125 µg/µl) e não observamos diferenças na eficiência do fenótipo de silenciamento para os genes testados.

#### **4.5.3. O fenótipo do RNAi de *Tc-zen1* na embriogênese de *T. castaneum***

Para *Tc-zen1*, gene que codifica um fator de transcrição que especifica as células da serosa, observamos que o RNAi afetou a viabilidade dos ovos independente da condição de umidade relativa. Este fenótipo foi discrepante ao descrito por Jacobs *et al.* (2013) que relatou fenótipo letal apenas para ovos mantidos em baixa condição de umidade relativa: ovos em alta UR possuíam alta viabilidade.

Duas hipóteses são desenhadas para explicar o fenótipo observado. A primeira esta associada a possível inespecificidade da dsRNA utilizada para o silenciamento. Neste trabalho, optamos por realizar o silenciamento gênico com apenas um fragmento de dsRNA de cada gene alvo. Há probabilidade da molécula de dsRNA desenhada silenciar, além do gene *Tc-zen1*, outro gene que seja letal embrionário. Diferentes autores relatam a necessidade de se empregar ao menos dois fragmentos distintos de dsRNA para avaliar o fenótipo de um dado gene (de Andrade e Hunter, 2016; Noh *et al.*, 2012; Whyard *et al.*, 2009). A segunda hipótese está ligada as cepas de *T. castaneum* utilizadas. Enquanto Jacobs *et al.* (2013) utilizou a cepa San Bernardino, neste trabalho foi utilizada a cepa Geórgia (GA-1). A cepa Geórgia (GA-1) é descrita na literatura como a cepa mais susceptível a variações ambientais, uma vez que é mantida a mais de 70 anos sob condições controladas de laboratório e com pouca variabilidade genética (Michalczyk (2009) *apud* Dickinson (2018)).

#### **4.5.4. O fenótipo do RNAi em conjunto de *Tc-elov1* e individuais de *Tc-elov101*, *Tc-elov102*, *Tc-elov103* e *Tc-elov104***

Foi observado que o silenciamento múltiplo para as quatro elongases acarretou num fenótipo embrionário letal que independe da umidade relativa quando a quantidade de dsRNA injetada foi de 0,15 µg. O silenciamento de

múltiplos genes pode acarretar numa saturação do sistema de RNAi. O sistema saturado leva a uma inibição da via de miRNA e que pode acarretar em letalidade. Além disso, o silenciamento em conjunto pode acarretar numa competitividade entre as dsRNAs injetadas (Miller *et al.*, 2012; Tomoyasu *et al.*, 2008). Contudo, o silenciamento gênico individual de *Tc-elovl02* mostrou fenótipo embrionário letal similar ao observado para o RNAi em conjunto das elongases. Este dado aponta para uma provável ação exclusiva da ausência de *Tc-elovl02* como responsável pela letalidade observada para o conjunto de *Tc-elovls*. Ainda em relação ao silenciamento grupal quando a quantidade de dsRNA foi reduzida (0,1 e 0,05 µg) observou-se uma diferença na viabilidade dos ovos frente às diferentes URs. Este resultado foi similar ao obtido para ovos silenciados apenas para *Tc-elovl04* e aponta para uma maior ação deste gene dentro desse contexto de silenciamento.

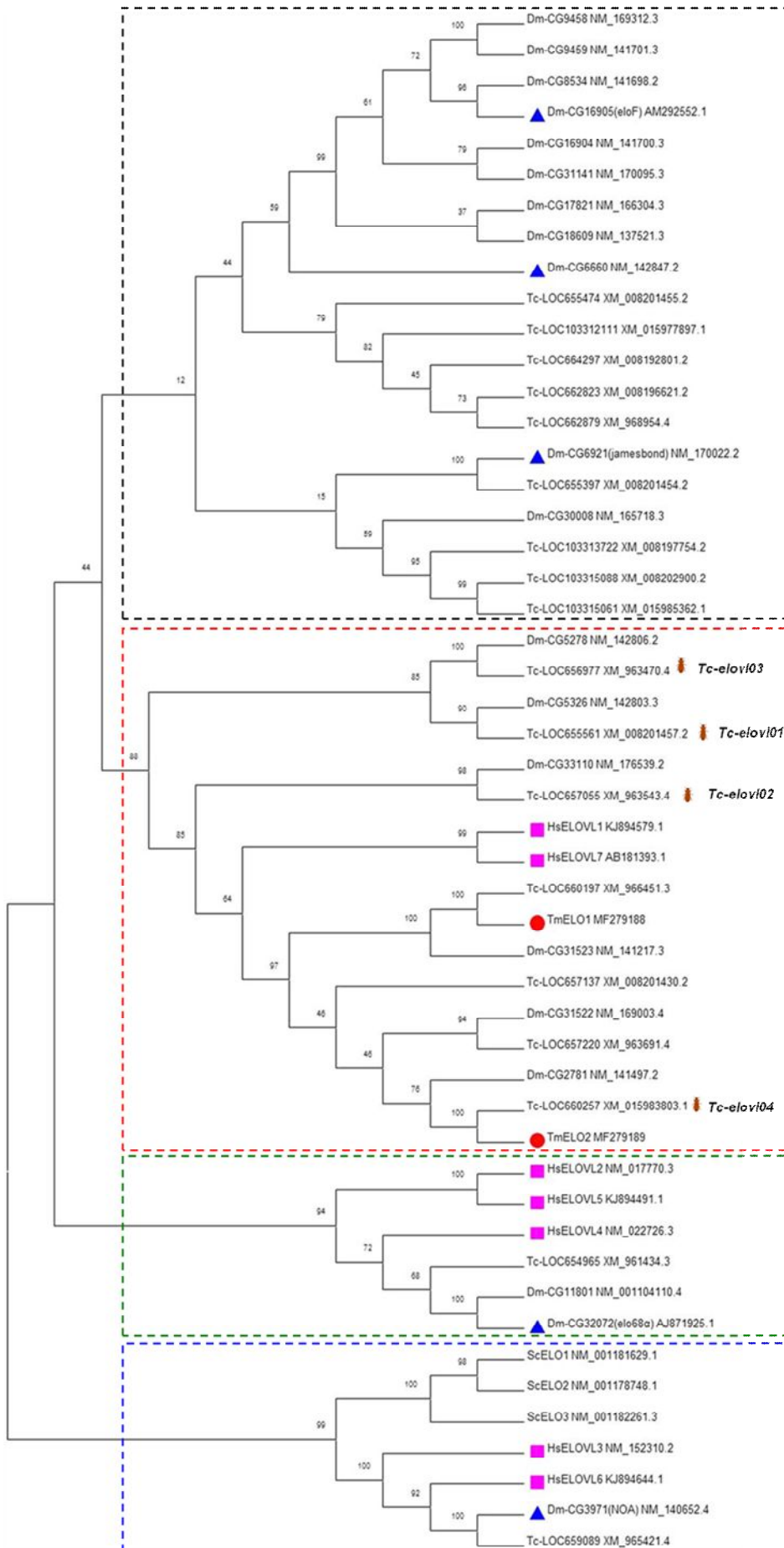
O gene *Tc-elovl04* é importante para a proteção dos ovos de insetos em baixas condições de UR. Este resultado é similar ao observado para ovos de *T. castaneum* silenciados para o gene *quitina sintase 1*, em que a cutícula serosa formada não tem quitina e apenas 30% das larvas eclodem em baixas condições de umidade relativa. Contudo, em elevada umidade, os embriões sem *quitina sintase 1* se desenvolvem normalmente (Jacobs *et al.*, 2013). Neste trabalho, foi demonstrado de forma inequívoca que a ausência de quitina afetou a formação da cutícula serosa.

Sobre *Tc-elovl01* e *Tc-elovl03*, quando silenciamentos individualizados foram realizados, não houve nenhum efeito sob a viabilidade dos ovos. Três hipóteses podem ser levantadas: 1) *Tc-elovl01* e *Tc-elovl03* não têm efeito na embriogênese de *T. castaneum*; 2) os genes não foram silenciados visto que não foi confirmado o silenciamento gênico para estas elongases ou 3) o silenciamento de *Tc-elovl01* e *Tc-elovl03* levam a um aumento da expressão de *Tc-elovl04* que compensa a falta dos genes silenciados. Ao realizarmos um silenciamento gênico em conjunto com *Tc-elovl01*, *03* e *04* observamos uma diferença na viabilidade em relação a UR o que pode ser explicada pelo silenciamento de *Tc-elovl04*. Não podemos afirmar que os demais genes foram silenciados. Com o silenciamento em conjunto de *Tc-elovl03* e *04* observamos que não há diferença na viabilidade dos ovos. Tal fenótipo pode ser uma ineficiência de silenciamento gênico.

Análises filogenéticas realizadas por Zuo *et al.* (2018) mostram que as quatro elongases de *T. castaneum* avaliadas neste trabalho agrupam no mesmo clado das elongases ELOVL1 e ELOVL7 de mamíferos (Figura 53). Os genes *elov1* e *elov7* de mamíferos codificam as enzimas que atuam na via de síntese de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Bond *et al.*, 2016).

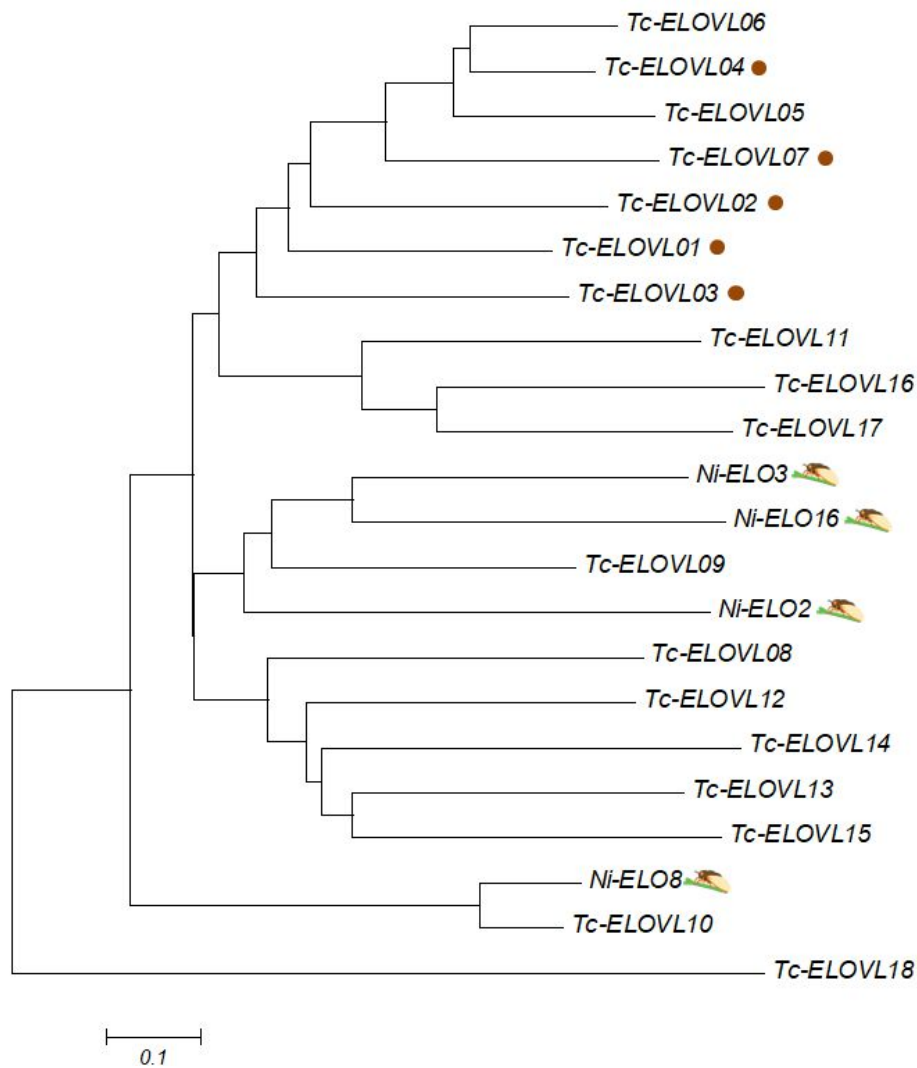
O gene *Tc-elov104* apresenta 86,8% de similaridade com *Tmelo2* (MF279189) descrita em *Tenebrio molitor* (Figura 53). O gene *Tmelo2* é expresso em todos os estágios de desenvolvimento sendo o estágio de ovo o que apresenta maior expressão. O silenciamento de *Tmelo2* em larvas de *T. molitor* não afeta sua sobrevivência. Contudo, a super expressão de *Tmelo2* apontou para uma possível atuação da enzima na síntese de AG de cadeia longa. A TmELO2 apresenta sete regiões transmembranares e predições apontam que estaria localizada no retículo endoplasmático (Zheng *et al.*, 2017). Aqui foi demonstrado que a Tc-ELOVL04 também apresenta 7 regiões transmembranares e estaria localizada no retículo endoplasmático das células.

A relevância de uma elongase para a impermeabilização cuticular já foi comprovada para mamíferos. Em *Mus musculus*, a deleção do *elov14* afeta a permeabilidade da epiderme. O mesmo gene afeta a formação de AGs de cadeia muito longa (>28C) (Cameron *et al.*, 2007; Vasireddy *et al.*, 2007). Apesar de desempenharem papel similar em diferentes organismos, *Tc-elov104* de *T. castaneum* e *elov14* de mamíferos (HsELOVL4 como representante) não agrupam na árvore filogenética (Figura 53). Os genes *elov14* dos mamíferos codificam as enzimas que atuam na via de síntese de AG saturados e poli-insaturados (Bond *et al.*, 2016).



**Figura 53: Árvore filogenética de elongases de levedura, insetos e humano.** A árvore foi construída com as sete sequências de *Homo sapiens* ELOVL1 a 7 (quadrados rosa); com as três sequências da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 a 3; as 20 sequências da mosca *D. melanogaster*, as 18 sequências de *T. castaneum* e duas das elongases do besouro *Tenebrio molitor* (círculos em vermelho). As quatro elovl estudadas nesta tese estão identificadas na imagem, à direita. Os triângulos em azul identificam as sequências já estudadas em *D. melanogaster*. A caixa em azul identifica as elongases dos seres multicelulares que se agrupam junto as três elongases de levedura. Caixa em verde identifica as elongases de insetos que se agrupam com as ELOVL2, 4 e 5 de humanos. Em vermelho as sequências que agrupam junto à ELOVL1 e 7 de *H. sapiens*. Caixa em preto identifica elongases exclusivas de insetos. Adaptado de Zheng *et al.* (2017).

Em ninfas da cigarrinha marrom, *Nilaparvata lugens*, quatro genes *elovl*, NiELO 2, 3, 8 e 16, são importantes para a proteção contra a perda de água e para a sobrevivência das ninfas quando expostas a 5% de UR. O aumento da permeabilidade cuticular está associado à alteração no perfil de hidrocarbonetos cuticulares. Contudo, as elongases de *N. lugens* não agrupam na árvore filogenética com a *Tc-ELOVL04* de *T. castaneum* (Figura 54) o que indica que diferentes elongases atuam em diferentes estágios do desenvolvimento dos insetos.



**Figura 54: Árvore filogenética de *T. castaneum* e *N. lugens*.** A árvore foi construída com as 18 sequências de *T. castaneum* (Tc-ELOVL01 a 18); e com as quatro sequências importantes para a impermeabilização cuticular de ninfas de *N. lugens* (Ni-ELO2, 3, 8 e 16). Os círculos em marrom indicam as sequências de elongase que foram silenciadas na presente tese.

Com o propósito de confirmar a especificidade do silenciamento para *Tc-elovl04*, foi realizado RT-PCR para as 18 elongases de *T. castaneum*. O silenciamento de *Tc-elovl04* parece ser específico, pois não foi observado silenciamento cruzado através do RT-PCR. Além disso, mais duas elongases, *Tc-elovl05* e *Tc-elovl06* foram identificadas como sendo expressas durante a embriogênese inicial de *T. castaneum*, além da expressão de quatro elongases, *Tc-elovl01* a *04*, descritas previamente por Vargas (2015).

A análise por PCR em tempo real (RT-qPCR) não foi capaz de comprovar o silenciamento gênico de *Tc-elovl04*. Os *primers* de RT-qPCR foram desenhados na mesma região na qual a dsRNA foi sintetizada e,



aparentemente, observamos a presença dessa dupla-fita dentro dos ovos. Recentemente o nosso grupo recebeu a informação de que moléculas de dsRNAs intactas são internalizadas em ovos de *T. castaneum*, quando da injeção em fêmeas adultas; esses dsRNAs dentro do ovo são lentamente degradados a partir das pontas, com o passar da embriogênese (Horn e Panfilio, comunicação pessoal). As demais elongases avaliadas (*Tc-elovl01*, *02*, *03*, *05* e *06*) não apresentaram alteração no perfil de expressão quando do silenciamento gênico de *Tc-elovl04*.

Não podemos afirmar de forma definitiva que o silenciamento de *Tc-elovl04* afeta a formação da cutícula serosa uma vez que não foi possível concluir os experimentos de avaliação bioquímica dos hidrocarbonetos de ovos silenciados (vide Apêndice A). Contudo, algumas evidências moleculares reforçam a teoria inicial desta tese: Gurská (2018) avaliou os genes responsivos ao fator de transcrição *Tc-zen1*, responsável pela especificação das células da serosa. Um dos genes que é ativado por *Tc-zen1* é *Tc-elovl04*.

#### **4.5.5. Durabilidade do RNAi na embriogênese de *T. castaneum***

A duração do silenciamento gênico em ovos de *T. castaneum* da cepa Georgia variou entre 16 e 50 dias após a injeção, dependendo do gene. No caso do silenciamento em conjunto de *Tc-elovl* observou-se um perfil por até 31 dias após a injeção. No caso de *Tc-zen1* o fenótipo de silenciamento foi observado por até 41 dias. O mesmo foi visto para o gene *Tc-verm*. A durabilidade do silenciamento é variável dentre os genes. Em ensaios realizados por Miller *et al.* (2012) com a cepa *pu11* de *T. castaneum*, foi demonstrado que o silenciamento gênico pode variar entre 75 e 175 dias após a injeção.

#### **4.5.6. O fenótipo do RNAi na sobrevivência das larvas eclodidas**

A superfície do exoesqueleto dos insetos em estágios pós-embrionários é coberta por lipídeos que são importantes para a impermeabilização e também para a comunicação química (Chapman, 2013). Diversas vias bioquímicas consecutivas vão acarretar na síntese de hidrocarbonetos. Essas vias são constituídas por uma variedade de enzimas como FAS, dessaturases, redutases e também elongases (Nelson e Cox, 2014). Visto a relevância das elongases para a formação do exoesqueleto, avaliamos se o RNAi das

elongases afetaria na formação da cutícula da larva e conseqüentemente na sua sobrevivência. O tempo de sobrevivência das larvas dos grupos selvagem, RNAi para *Tc-elov107* e *Tc-zen1* varia em relação à umidade relativa; quanto maior a UR, maior a sobrevivência. Contudo, esse padrão mudou quando observamos o fenótipo acarretado pelo silenciamento em conjunto de *Tc-elov1*: as larvas atingem 50% de mortalidade com o mesmo tempo, independente da UR.

## **5. CAPÍTULO II – A IMPORTANCIA DA CUTÍCULA BLASTODERMAL PARA A PROTECAO DE COLLEMBOLA**

O segundo capítulo descreve a relação da formação da cutícula blastodermal com a resistência dos ovos a dessecação nos colêmbolos, *Orchesella cincta* e *Folsomia candida*. Os resultados apresentados aqui foram obtidos no Department of Ecological Science da Vrije Universiteit Amsterdam, sob orientação do Professor Dr. Dick Roelofs e Professor Dr. Gustavo Rezende.

## 5.1. MANUSCRITO

**Blastodermal cuticle formation contributes to egg resistance to desiccation in the springtails *Orchesella cincta* (Collembola: Entomobryidae) and *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae): ecological implications for hexapod terrestrialization during evolution**

**Authors: Helena Carolina Martins Vargas<sup>1,2</sup>; Dick Roelofs<sup>2</sup>; Gustavo Lazzaro Rezende<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Bociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Ecological Science, Faculty of Science, Vrije Universiteit, De Boelelaan 1085, 1081, HV Amsterdam, The Netherlands.

### **Abstract**

The colonization of land was a major event in the history of life on Earth. Among animals, the insects had a staggering success in the conquest of the land, due to traits usually associated with post-embryonic life stages. On the other hand, the role of the egg stage for insect terrestrialization has been largely overlooked. In hexapods (insects and the "entognathans" proturans, collembolans and diplurans), eggs freshly laid are covered by eggshell layers, produced during oogenesis within the maternal body, collectively named here as 'chorion'. In insects, during early embryogenesis, the blastoderm differentiates in embryonic cells and two extraembryonic tissues: serosa and amnion. Serosal cells synthesize the serosal cuticle, an extracellular matrix that lies beneath the chorion, becoming the innermost eggshell layer. This cuticle is important to protect the insect egg against water loss. In non-insect hexapods, such as springtails (Collembola), the blastodermal cells synthesize a blastodermal cuticle. Before and during blastodermal cuticle formation, the springtail egg uptakes water and increases in volume which leads to chorion rupture. Here we investigated the relationship between blastodermal cuticle formation and egg resistance to desiccation in two springtails species, *Orchesella cincta* and *Folsomia candida*. Embryogenesis of *O. cincta* is faster

than *F. candida*, taking 156 and 278 hours after egg laying for its completion, respectively. In *O. cincta* and *F. candida* chorion rupture and blastodermal cuticle exposure happens with 22 and 29% of total embryogenesis, respectively. In both species an increase in egg protection against shrinkage occurs concomitantly with the formation of the blastodermal cuticle. Blastodermal cuticle formation also increases egg viability in a dry environment but this protection varies between species: while *O. cincta* eggs survive at least 2 hours outside a humid environment the survival period recorded for *F. candida* eggs is of only 15 minutes. These results show that the augment in egg resistance to desiccation due to the production of a cuticle at early embryogenesis is conserved during Hexapoda evolution. We suggest that the formation of this protective cuticle is an ancestral trait among hexapods, predating and facilitating the staggering process of terrestrialization that occurred in insects.

**Keywords:** blastodermal cuticle, egg resistance, desiccation, embryogenesis, land colonization, springtails, water loss.

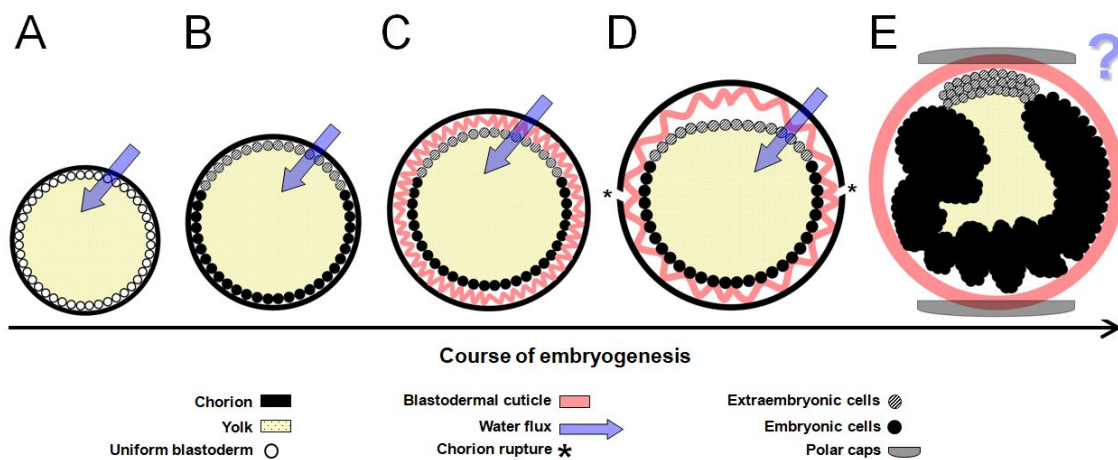
## Introduction

Life originated on water and the colonization of land was a significant event for the evolution of many organisms on Earth, such as arthropods (Little, 1983; Selden, 2016). The Arthropod phylum is comprised of the paraphyletic "Crustacea" and the monophyletic Chelicerata, Myriapoda and Hexapoda (constituted of Collembola, Protura, Diplura and Insecta) (Kukalová-Peck, 1987; Misof *et al.*, 2014) (Suppl. Figure 1). It is estimated that during arthropod evolution independent events of terrestrialization occurred, standing out the ones of hexapods, myriapods and chelicerates that had a staggering eminence on land conquer (Dunlop *et al.*, 2013; Grimaldi e Engel, 2005; Rota-Stabelli *et al.*, 2013). Specifically for the insects, colonization of land led to an unparalleled diversification among animals. There are 1,527,660 described species of extant animals; arthropods and insects accounts for 79 and 66% of the total, respectively. In other words, considering all living animals species, 2/3 are insects (Zhang, 2011).

In order to survive on land, insects must have traits that allow them to overcome low or irregular water availability, such as a small body size, an internalized respiratory system and an exoskeleton that minimizes water loss (Dunlop *et al.*, 2013; Hadley, 1994; Little, 1983). Moreover, it was suggested that traits related to the egg stage contributed for their successful terrestrialization in addition to juvenile and adult traits (Zeh *et al.*, 1989). The insect egg when freshly laid is covered by maternally produced eggshell layers. These maternal eggshell layers will be collectively termed here as 'chorion'. During the early stages of insect embryogenesis, the blastoderm differentiates in three types of cells: the two extraembryonic tissues, serosa and amnion, and the embryonic ones. After differentiated the serosa cells envelop the embryo and secrete the serosal cuticle, an extracellular matrix (Handel *et al.*, 2000; Panfilio, 2008; Rezende *et al.*, 2016, 2008). This cuticle, produced post-zygotically and present in most insects, constitutes the innermost eggshell layer, being localized below the chorion, and is important to protect the insect egg against water loss (Jacobs *et al.*, 2013; Rezende *et al.*, 2016, Rezende *et al.*, 2008). The serosa and its cuticle are considered as crucial traits that fostered the conquer of land during insect evolution (Jacobs *et al.*, 2013). However, nothing is known about the role of post-zygotic cuticle prior to insect appearance during evolution, given that comparative studies with other arthropods are still lacking.

With the exception of insects, all the other arthropods produce post-zygotic eggshell layers named blastodermal cuticle (also termed blastodermic cuticle or blastoderm cuticle) (Machida, 2006; Rezende *et al.*, 2016). It is feasible to study the blastodermal cuticle in Collembola, a group closely related to the insects, but lacking such a tremendous diversification (Suppl. Figure 1). This approach is similar to the sister group comparison methodology (Zeh *et al.*, 1989). Collembolans, colloquially called 'springtails', accounts for only 0.5% of the total species number of living animals and its embryogenesis and blastodermal cuticle formation has been described in many species (Bretfeld, 1963; Jura, 1972; Jura *et al.*, 1987; Machida, 2006; Prowazek, 1900; Tamarelle, 1981; Tiegs, 1942; Tomizuka and Machida, 2015; Uemiya and Ando, 1987) (Figure 1). In springtails, during early embryogenesis the blastoderm differentiates in two types of cells: an extraembryonic tissue and the embryonic

rudiment (Figure 1A, B). Depending on the species the blastodermal cuticle is secreted by the uniform undifferentiated blastoderm cells or by the differentiated blastoderm (Figure 1C). Concomitant with these processes the springtail egg increases in volume due to water uptake which eventually leads to chorion rupture (Figure 1D), thus forming the polar caps (i.e. chorion remnants, which lies at both poles of the egg) and the blastodermal cuticle becomes the sole protective egg layer (Figure 1E) (Briti, 1951; Jura, 1972; Jura *et al.*, 1987; Machida, 2006; Marshall and Kevan, 1962; Rezende *et al.*, 2016; Tomizuka and Machida, 2015; Uemiya and Ando, 1987). The number of blastodermal cuticles can varies from one to four layers, depending on the species (Jura, 1972). Although blastodermal cuticle is generically described as resistant barriers that protect the egg (Machida, 2006; Rezende *et al.*, 2016; Tiegs, 1942) "nothing is actually known as to their permeability to water or air", as stated by Jura (1972). Here we analyzed the relationship between blastodermal cuticle formation and egg protection against water loss in two springtails species, *Orchesella cincta* and *Folsomia candida*.



**Figure 1: Dynamics of blastodermal cuticle formation and chorion rupture during early springtail embryogenesis.** Schemes of egg cross-section. Increase in egg size is due to water uptake. (A) Early egg with cells at the uniform blastoderm stage. (B) Blastoderm cells differentiate into embryonic and extraembryonic ones. (C) The differentiated blastoderm produces a blastodermal cuticle that is initially wrinkled. (D) Extraembryonic cells move inward the egg while the increase in egg volume leads to chorion rupture. (E) Chorion remnants become the polar caps and embryogenesis proceeds within the expanded blastodermal cuticle that is now the sole egg cover. At this stage, egg permeability to water is unknown. For the sake of simplicity, yolk cells are not shown. Depending on the species, the blastodermal cuticle is secreted before or after blastoderm differentiation, is smooth or with ornaments, is one or more cuticles. The degree of egg size increase varies among species, as well as the embryonic stage where chorion rupture occurs. Based on Marshall and Kevan 1962, Bretfeld 1963, Jura 1967, 1972, Uemiya and Ando 1987, Tomizuka and Machida 2015, Rezende *et al.* 2016.

*Orchesella cincta* (Entomobryidae) is a litter-dwelling (epidaphic) species. Adults are dark and measure about 6 mm in length. Its embryogenesis lasts about 6 days at 19-24 °C, its egg size at the chorion rupture stage is about 200 - 250 µm and two blastodermal cuticles are produced. The blastodermal cuticle is covered with thorns (Bretfeld, 1963). Its postembryonic development takes at least 44 days before reaching the adult stage (Hopkin, 1997; Joosse *et al.*, 1972). This species reproduces sexually with indirect sperm transfer through spermatophores. The individuals molt during its adult life, and sperm cells cannot be stored by females. After each adult molt a female enters a new reproductive cycle and take up a new spermatophore (Hopkin, 1997). *Orchesella cincta* is employed in ecotoxicology tests (Hopkin, 1997), has its genome sequenced (Faddeeva-Vakhrusheva *et al.*, 2016) and molecular techniques were recently developed for this species, such as RNAi-driven gene silencing and *in situ* hybridization in eggs (Konopova and Akam, 2014).

*Folsomia candida* (Isotomidae) is a parthenogenetic soil-dwelling (eudaphic) species. Adults are unpigmented, blind and measure between 1 to 3 mm in length. Its embryogenesis lasts about 10 days and hatchlings take 24 days to reach the adult stage at 20 °C. Its eggs are smaller than *O. cincta* ones, they measure about 80 µm when laid and increase its size up to 165 µm at the chorion rupture stage (Marshall and Kevan, 1962). Adults can survive under dry conditions through the production of sugars and polyols and are able to absorb water vapor (Fountain and Hopkin, 2005; Hopkin, 1997; Roelofs *et al.*, 2013). For more than 40 years, *F. candida* has been used as a model organism for the study of soil contamination and is used in an internationally standardized test (ISO 11267) to assess the level of toxicity of contaminated soils and to monitor their remediation (Fountain and Hopkin, 2005). The *F. candida* genome was recently sequenced (Faddeeva-Vakhrusheva *et al.*, 2017).

In the present work both species were evaluated regarding their period of complete embryogenesis at constant temperature, the stage of embryogenesis when chorion rupture occurs, egg water permeability and egg viability in a desiccating condition during embryogenesis. We found that blastodermal cuticle formation increases egg protection against water loss in both species, although at distinct levels.



## Methods

### Springtail rearing

Specimens of *O. cincta* and *F. candida* (Berlin strain) are maintained for more than 20 years at the Department of Ecological Sciences, Animal Ecology Section, Vrije Universiteit (Amsterdam, The Netherlands) (Agamennone *et al.*, 2015; Sterenborg and Roelofs, 2003). Many years ago *O. cincta* individuals were collected from several forests in The Netherlands (van Straalen *et al.*, 1987). Whenever necessary, specimens from the wild were introduced in the laboratory creation to restore vigor. Both species were reared in a climatic room set at 15 °C, 75% relative humidity (RH) and 16:8 hour light:dark photoperiod. *Orchesella cincta* was maintained in PVC jars (25 cm diameter) containing twigs and plaster of Paris (500g plaster of Paris and 500 ml demineralized water). Juveniles and adults were feed on algae grown over small pieces of twig kept in a humid environment. Every two days, demineralized water was added to the jars of both species to keep the plaster moist (Suppl Figure 2). *Folsomia candida* was kept in plastic jars (20 x 15 cm) filled with a mixture of plaster of Paris (Siniat-Prestia, multiple purpose plaster) and charcoal (CAS 7440-44-0, Merck, Germany) (500g plaster of Paris, 500 ml demineralized water and 50g charcoal) (Suppl Figure 3). Juveniles and adults were feed with commercial yeast (Dr. Oetker, Bielefeld, Germany).

### Temperature of the assays

All assays were performed at 20 °C. In this temperature, *O. cincta* egg production is high (Joosse *et al.*, 1972) and for *F. candida* this is the ISO standard test temperature, close to the optimal hatching temperature, which is 21 °C (Fountain and Hopkin, 2005).

### Egg laying procedures

Egg laying was performed according to the specific characteristics of each species reproduction process. For *O. cincta*, adults were collected from rearing jars, sexed and 10 couples were transferred to small circular jars (5 cm diameter) containing plaster of Paris or plaster of Paris-charcoal and a piece of bark peeled off of a twig (Suppl. Figure 4A). Adults were fed on algae grown on top of these barks. Since a female starts a new reproductive cycle after each

adult molt, the jars were checked daily to determine when they molted. After molting the jars were carefully observed to check the presence of eggs. As soon as the first eggs were observed, all animals were transferred to a new jar and egg laying occurred during eight or 12 hours. For each egg laying procedure, 10 small jars were used (a total of 100 couples). Plaster humidity was maintained by adding demineralized water every day.

For *F. candida*, large adult parthenogenetic females were collected from the rearing jars and transferred to plastic pots (10 x 8 cm) containing plaster of Paris-charcoal (Suppl. Figure 4B). Each pot contained 15-20 females and for each egg laying procedure, 10 pots were used. All females were left laying eggs directly onto the plaster surface for eight hours. After this period, all females were removed from containers. Plaster humidity was maintained by adding demineralized water every two days.

After the females were left laying for eight or 12 hours the age of the obtained eggs were between 0-8 or 0-12 hours. The age of the eggs were assigned as the mid period, i.e. were considered as being  $4\pm 4$  or  $6\pm 6$  hours old, respectively.

### **Defining the total period of embryonic development**

Groups of at least 20 eggs obtained as described above were left developing at 20 °C and 75% RH and observed in the stereomicroscope at two and one hour intervals, for *O. cincta* and *F. candida*, respectively. For each species three independent experiments with at least three replicates each were performed. A total of 225 and 315 eggs were evaluated for *O. cincta* and *F. candida*, respectively. The period of complete embryonic development was defined when 50% of the juveniles hatched.

### **Analysis of chorion rupture**

Replicates of 25 or 30 eggs were used to evaluate when chorion rupture occurs in both species. Every hour the number of eggs showing the exposed blastodermal cuticle and the polar cap (i.e. the ruptured chorion) was counted under a stereomicroscope. For *O. cincta* two independent assays were performed, one with two replicates, the other with three replicates with a total of 140 eggs employed. For *F. candida* three independent assays were performed,

each with at least three replicates, with a total of 315 eggs employed. The percentage of development when 50% of the chorion ruptures was defined as the period at which this event occurs.

### **Analysis of egg permeability to water**

To test if water permeability changes in springtail eggs during embryogenesis, eggs samples were analyzed, each at different stages of development. For *O. cincta*, groups of 20 or 25 eggs were collected with a paint brush and placed onto a polycarbonate filter (25 mm diameter, 8 mm pore, Poretics Corporation), deposited on a drop of demineralized water. The polycarbonate filter with eggs was blotted onto a dry filter paper and left air-drying for two periods: 15 minutes or 2 hours. Temperature and relative humidity of the assays varied between 21.2 - 23.9 °C and 45 - 76%, respectively. For each stage of embryogenesis the number of intact or shrivel eggs were counted under a stereomicroscope. A similar procedure was performed with *F. candida*, however groups of 15 or 20 eggs were exposed for 5 or 15 minutes air-drying onto the dry paper at 22 °C. Relative humidity of the assays varied between 46 - 58%. A total of 890 and 1,435 eggs were evaluated for *O. cincta* and *F. candida*, respectively. The percentage of development when 50% of the eggs are protected against shrinkage was defined as the period at which this event occurs.

### **Analysis of egg viability under dry conditions**

Group of eggs, at different stages of embryogenesis, were transferred from moist plaster onto a polycarbonate filter (25 mm diameter, 8 mm pore, Poretics Corporation), blotted onto a dry filter paper and left air-drying for 15 minutes or 2 hours (Suppl. Figure 5). After these periods, eggs were returned to moist plaster until embryogenesis completion, when egg viability was checked through juvenile hatching. For each species and each stage of embryogenesis a total of at least two independent assays were performed, each with at least two replicates. Each replicate consisted of at least 15 for *O. cincta* and 25 eggs for *F. candida*. A total of 960 and 1,655 eggs were evaluated for *O. cincta* and *F. candida*, respectively. Control replicates kept in moist plaster throughout embryogenesis were used to normalize juvenile hatching, summing up a total of

585 and 755 eggs of *O. cincta* and *F. candida*, respectively. Temperature and relative humidity of these assays varied between 21.2 - 23.9 °C and 45 - 78%, respectively.

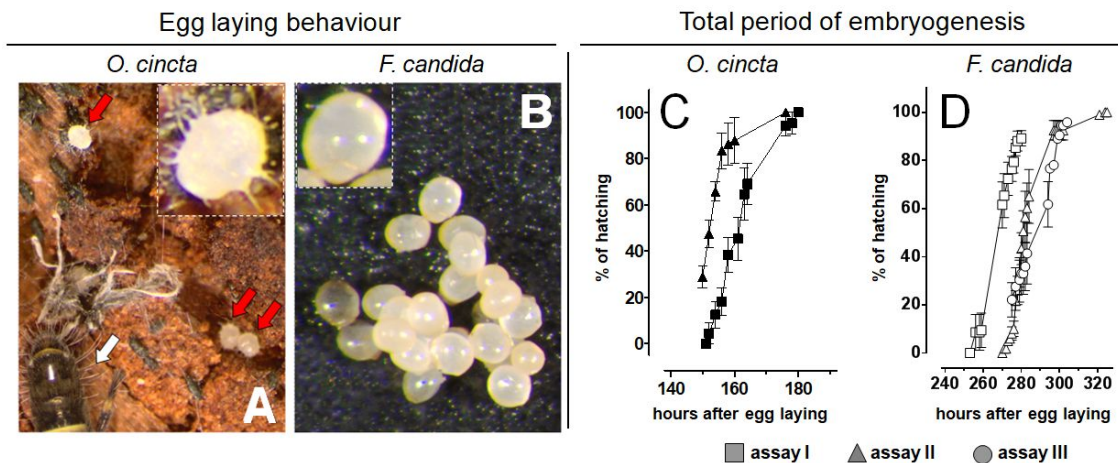
### **Statistics analyses**

For all experiments, mean and standard error were calculated. Two-way analysis of variance (ANOVA) ( $P < 0.0001$ ) was performed in the assay of egg viability under dry conditions.

### **Results**

#### **Process of egg laying and the total time of embryonic development differs between springtail species**

While eggs of *O. cincta* are laid individually or in pairs, on the top of the bark or within its indentations (Figure 2A) the eggs of *F. candida* are laid in clutches onto the plaster (Figure 2B). The rate of egg production is lower in *O. cincta* than in *F. candida* and thus more eggs were employed, in each assay, for the later species. Embryogenesis occurs faster in *O. cincta* than in *F. candida* (Figure 2C, D): *O. cincta* juveniles hatch with  $156 \pm 5$  hours after egg laying (HAE) (approximately 6.5 days) with  $94 \pm 4\%$  of viability whereas *F. candida* juveniles hatch with  $278 \pm 11$  HAE (approximately 11.6 days) with  $90 \pm 10\%$  of viability. The range of juvenile eclosion for *O. cincta* and *F. candida* was, respectively, between 150-180 and 256-324 HAE (Table 1). Given the differences between the total periods of embryogenesis, the following results will be presented in percentages of embryogenesis, in order to allow a direct comparison between species.



**Figure 2: Egg laying behavior and total period of embryogenesis differs between species.** (A) Eggs of *O. cincta* (red arrows) are laid singly or in pairs. Chorion rupture already occurred in these eggs. White arrow: posterior part of an adult body. (B) Eggs of *F. candida* are laid in a cluster. Insets show magnified eggs. As described in the Introduction, *O. cincta* eggs are larger than *F. candida* ones. (C, D) Cumulative juvenile hatching is depicted for eggs developed at 20 °C and 70% RH. Embryogenesis occurs faster in *O. cincta* (C) than in *F. candida* (D). Each geometric shape represents an independent assay and each point represent mean and standard error, normalized by total hatching. A total of 225 and 315 eggs of *O. cincta* and *F. candida* were evaluated, respectively.

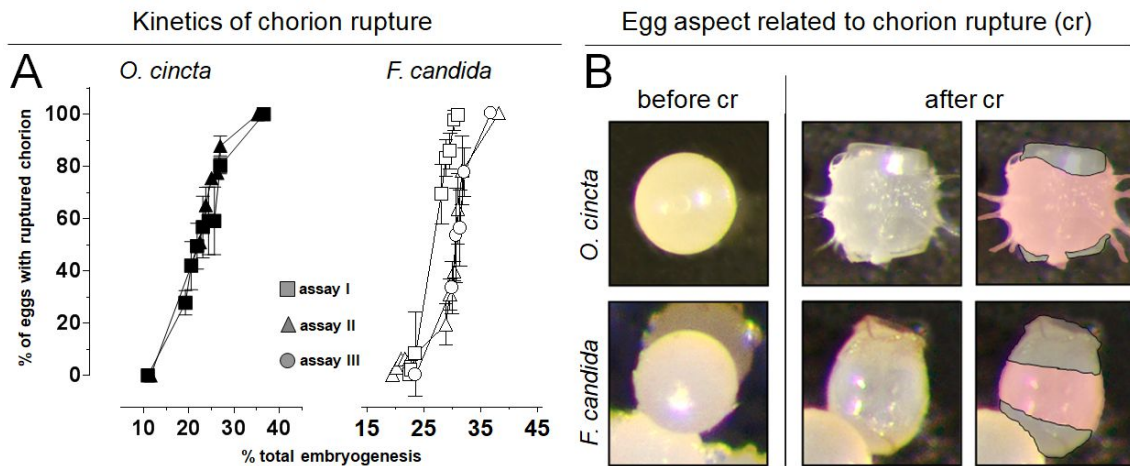
**Table 1: Parameters related to springtail embryonic development at 20 °C**

Species	Hours after egg laying			% Viability
	Embryogenesis completion <sup>a</sup>	First juvenile	Last juvenile	
<i>Orchesella cincta</i>	156 ± 5	150	180	94 ± 5
<i>Folsomia candida</i>	278 ± 11	256	324	90 ± 10

a: Mean hatching of 50% of juveniles.

### Maternal chorion rupture occurs within the first third of embryogenesis

Here, we investigated the timing of chorion rupture during embryogenesis (Figure 3). For both species chorion rupture occurs within the first third of embryogenesis (Figure 3A). In *O. cincta* and *F. candida* the chorion ruptures with 22 and 29% of total embryonic development, respectively. This period was defined as when 50% of all chorions ruptured. Before chorion rupture, eggs of both species are spherical and with a smooth surface (Figure 3B). The blastodermal cuticle of *O. cincta* has thorns and seems more robust while the *F. candida* one is smooth and seems more fragile.

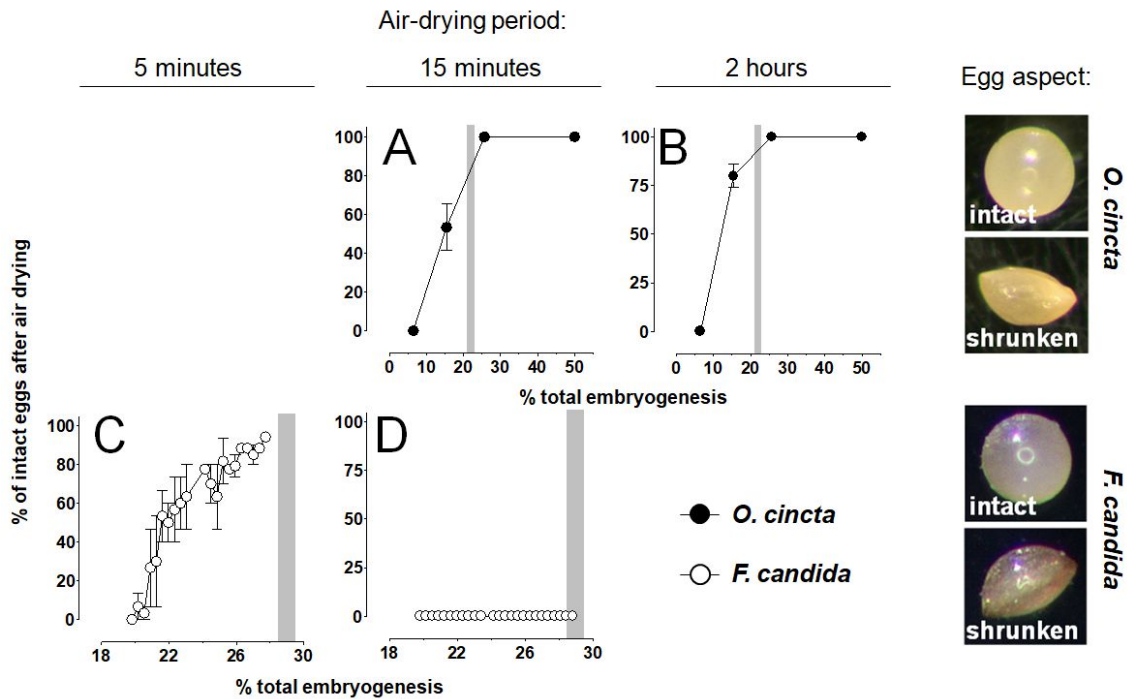


**Figure 3: Chorion ruptures and blastodermal cuticle is exposed within the first third of embryogenesis.** For both species eggs developed at 20 °C. (A) Chorion rupture of *O. cincta* and *F. candida* eggs were recorded. Each geometric shape represents an independent assay and each point represent mean and standard error, normalized by total eggs employed per assay. A total of 140 and 315 eggs of *O. cincta* and *F. candida* were evaluated, respectively. (B) Egg aspect before and after chorion rupture. Pseudocolour in right-most panels indicate the polar caps (in grey) and the exposed blastodermal cuticles (in pink).

### Formation of the blastodermal cuticle increases egg protection against water loss

Prior to gastrulation the blastodermal cuticle is produced within the chorion and due to the increase in egg volume the chorion ruptures and the blastodermal cuticle become the sole protective layer of the developing embryo. To assess if blastodermal cuticle formation increases egg protection against water loss, eggs were exposed to air-dry conditions in different stages of embryogenesis (Figure 4).

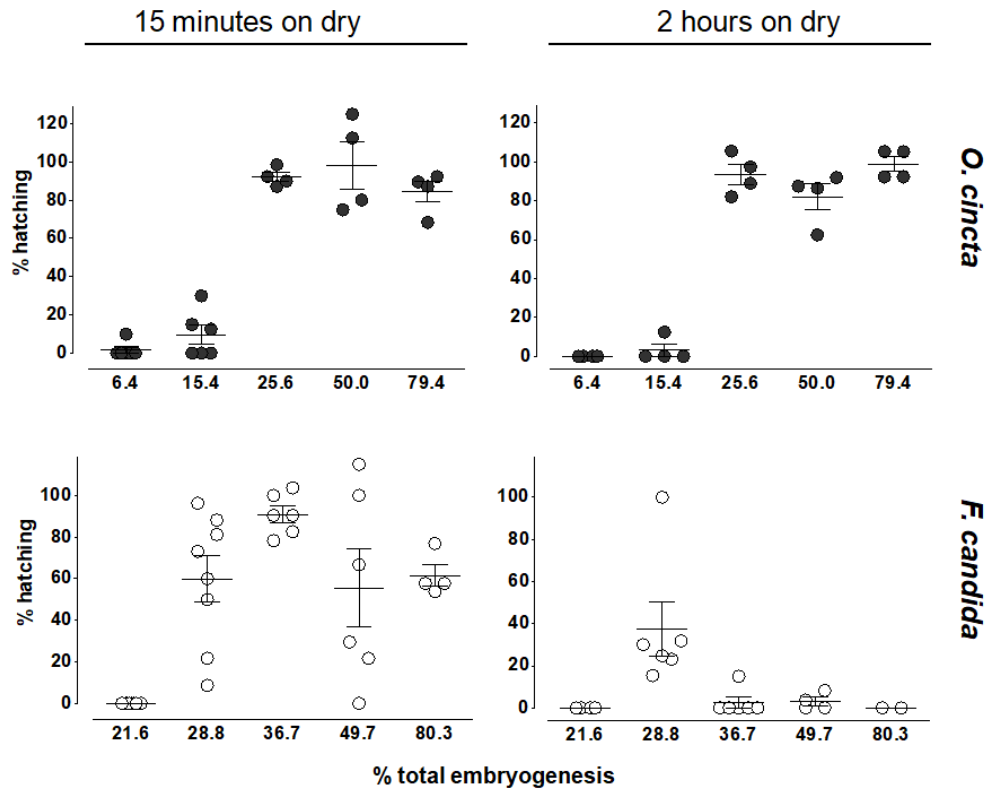
Eggs of *O. cincta* desiccated on dry air for 15 minutes or two hours (Figure 4A, B). An increase in egg protection against water loss was observed in both conditions. Eggs of *F. candida* were left desiccating on dry air for five or 15 minutes (Figure 4C, D). When eggs desiccated for only five minutes an increase in water loss protection was observed. However, all eggs that desiccated for 15 minutes shriveled. Assuming when 50% of the eggs are protected against shrinkage (Figure 4A and C), it was defined that the blastodermal cuticle is formed in *O. cincta* and *F. candida* with 15 and 22% of embryogenesis, respectively.



**Figure 4: Egg permeability changes during embryogenesis at 20 °C.** (A, B) Eggs of *O. cincta* were air-dried for 15 minutes or two hours, at different embryonic ages. (C, D) Eggs of *F. candida* were air-dried for five or 15 minutes, at different embryonic ages. The percentage of intact eggs (i.e. that did not shrink) was recorded. A total of 890 and 1435 eggs of *O. cincta* and *F. candida*, respectively, were evaluated. Grey bars indicate the period of chorion rupture. Right-most panels indicates the aspect of intact and shrunken eggs.

### Blastodermal cuticle formation increases egg viability in a dry environment

The relevance of blastodermal cuticle formation for egg viability under dry conditions was assessed (Figure 5). Eggs developing in moist plaster were transferred at different ages to a dried filter paper to air-dry for 15 minutes or 2 hours. After this period, eggs were returned to moist plaster and viability (hatching rates) was evaluated at the end of embryogenesis. Eggs of both species die under dry conditions before blastodermal cuticle formation but they survive after this cuticle is formed. Eggs of *O. cincta* are comparatively more resistant and survive with high viability rates for both 15 minutes and two hours outside the water. On the other hand, eggs of *F. candida* are less resistant, and perish after two hours in a dry environment, having high viability only for the 15 minutes period of desiccation.



**Figure 5: Formation of the blastodermal cuticle bestow protection against water loss.** Eggs developing in moist at 20 °C were transferred to dry filter paper in the moments indicated in the x-axis. For each time point, eggs were left drying for 15 minutes or 2 hours, when they were returned to moist until embryogenesis completion, when hatching rates were recorded. Data are expressed as percent viability, normalized from control samples, kept under moist conditions throughout development.

## Discussion

Springtails are widely distributed, ranging from moist soils and tree tops to extreme habitats, such as desert or polar regions (Greenslade, 1981; Hopkin, 1997). The species employed here occupy distinct microhabitat: while *O. cincta* lives above the soil, within the litter (*i.e.* is an epidaphic species), *F. candida* lives within the soil (is an edaphic one) (Fountain and Hopkin, 2005; Hopkin, 1997). Two of the main abiotic factors that delimit collembolans distribution are temperature and water availability (Hopkin, 1997).

All assays here were undertaken at 20 °C, once eggs of both species show high survival at this temperature (Fountain and Hopkin, 2005; Liefting *et al.*, 2010). The period of complete embryogenesis at a given temperature is known for several species (Table 2) and our data is in accordance with previous descriptions for *O. cincta* and *F. candida*, *i.e.* 6.5 and 11.6 days, respectively.



There is an inverse correlation between temperature and the period of embryogenesis (Hopkin, 1997), as observed for insect eggs (Farnesi *et al.*, 2009). Temperature also affects egg size, resilience, its production and also egg dormancy. *Orchesella cincta* females that were acclimated and oviposited at 16 °C produced eggs that are larger and more resistant to temperature variation than eggs laid from females that were acclimated and oviposited at 20 °C (Liefing *et al.*, 2010). *Folsomia candida* females that were acclimated and oviposited at 24 °C produced eggs that were able to develop between 16 and 26 °C, but not at 28 °C. If females were acclimated at 28 °C, a quarter of the population produced viable eggs at this temperature. Most of the females kept one month at 28 °C did not produce eggs, but when they were returned to 24 °C they resumed laying normal eggs after one or two days (Marshall and Kevan, 1962). Eggs of the temperate-dwelling *Isotoma viridis* are nondormant if they develop at  $\geq 15$  °C but they enter a quiescent-type of dormancy, where juveniles complete their embryogenesis, but do not hatch, if they develop at  $\leq 14$  °C. These quiescent eggs can hatch after 319 days if the temperature is raised to  $\geq 16$  °C (Tamm, 1986). Overall, the immobile egg is a life stage that, depending on the species, lasts for weeks or months, due to a slow rate of embryogenesis or due to dormancy. During this long period the springtail egg is susceptible to predators, opportunistic microorganisms and desiccating conditions (Christiansen, 1964; Hopkin, 1997).

**Table 2: Comparative periods of springtail embryogenesis at different constant temperatures reported in the literature**

Species	Temperature (°C)	Period of embryogenesis (days)	Reference
<i>A. armatus</i>	24	8	Britt 1951
<i>E. nivalis</i>	20	7	Hopkin 1997
<i>F. candida</i>	16	18-20	Marshall n Kevan
	20	10-15	Marshall n Kevan
	20	11.6	The present work
	22	9-10	Marshall n Kevan
	26	7-9	Marshall n Kevan
<i>H. manubrialis</i>	10	36	Ripper 1930
	22	19	Ripper 1930
<i>O. cincta</i>	10	20	Bretfeld 1963
	10	20.9	Liefting et al 2010
	15	10.3	Liefting et al 2010
	20	6	Liefting et al 2010
	20	6	Hopkin 1997
	20	6.5	The present work
	19-24	6	Bretfeld 1963
<i>T. cuspidatus</i>	5	80	Tomizuka and Machida 2015
<i>T. ishibashi</i>	(room temperature)	10	Uemiyama n Ando, 1987

Desiccation resistance, *i.e.* the ability of an organism to survive in an arid environment, occurs through the combination of three factors: the rate of water loss, dehydration tolerance (the amount of lost water withstand by the organism prior to its death) and body water content (Hadley, 1994). Comparatively, organisms that stay alive for longer periods of drought are considered as more desiccation resistant. Due to their small size, juveniles and adults of many springtails species are prone to dehydrate when they are outside water or in an atmosphere that is not saturated with water vapour (*i.e.* with a relative humidity below 100%) (Hopkin, 1997; Kærsgaard *et al.*, 2004). In these cases, different strategies can be employed to minimize desiccation stress, such as: lower rate of integument transpiration or quick water reabsorption through the ventral tube (collophore) (Verhoef and Witteveen, 1980), short life cycle, anhydrobiosis or ecomorphosis (Greenslade, 1981), water vapour absorption through the production of osmolytes (Bayley, 1999), among other strategies (Hopkin, 1997; Kærsgaard *et al.*, 2004; Marx *et al.*, 2012). In addition, the literature also describes the existence of desiccation resistant eggs, often associated with egg

dormancy, as a strategy to sustain springtail life cycle, until more favorable moist conditions are available (Greenslade, 1981; Hopkin, 1997; Wallace, 1968). However, the mechanisms of how these eggs withstand water loss were never described.

The first process that increases the egg resistance to desiccation in springtails is water uptake (Briti, 1951; Marshall and Kevan, 1962; Uemiya and Ando, 1987), once it increases the body water content. This uptake occurs during early embryogenesis, prior to blastodermal cuticle synthesis. After its formation water permeability decreases, the egg is more protected against water loss and most likely, water uptake ceases. Both processes (initial water uptake and then blastodermal cuticle formation) increase the egg resistance to desiccation. It is possible that other mechanisms occur, such as the production of osmolytes. In addition, blastodermal cuticle might also protect springtail eggs against excessive water entrance during flooding, when eggs are kept submerged for long periods in a dormant state (Tamm, 1986, 1984).

We were able to describe here that blastodermal cuticle formation and chorion rupture occurs in *O. cincta* with 15 and 22% of embryogenesis (1 and 1.4 days), respectively. In *F. candida* both processes occurs a little later, with 22 and 29% (2.5 and 3.3 days) of embryogenesis, respectively. Although previous papers described springtail embryogenesis (Bretfeld, 1963; Jura, 1972; Jura *et al.*, 1987; Prowazek, 1900; Tamarelle, 1981; Tiegs, 1942; Tomizuka and Machida, 2015; Uemiya and Ando, 1987) they do not specify when these two events happen. Although the blastodermal cuticle ensures egg viability outside the water for both species, *O. cincta* eggs are more resistant to water loss than *F. candida* ones. This difference might be related with morphological and structural aspects of their blastodermal cuticles. In *O. cincta* this cuticle is more robust and well structured: after juvenile hatching, the cuticle maintains its form and seems an empty bowl. On the other hand the *F. candida* blastodermal cuticle, after juvenile hatching, loses its shape and seems a “torn wet paper” (data not shown), suggesting that this cuticle is more delicate and thinner. Curiously, a similar phenomenon was observed in mosquitoes. After serosal cuticle formation, *Aedes aegypti* eggs resist desiccation much more than *Culex quinquefasciatus* ones and there is a clear structural difference: while the *Ae.*

*aegypti* serosal cuticle is well-structured the *Cx. quinquefasciatus* one is much more fragile (Farnesi *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2014).

In *F. candida* there is a decrease in egg resistance to desiccation after the blastodermal cuticle is formed (see Figure 5B, the two last time points in the 15 min assay; the three last time points in the 2 h assay). This might be related with an active role of extraembryonic cells in protecting against water loss, as previously suggested (Tamarelle, 1981). Again, a similar function has been addressed to serosal cells in insects (Jacobs *et al.*, 2013) and a similar pattern is observed in the mosquito *Anopheles gambiae* (Goltsev *et al.*, 2009).

An interesting difference in egg resistance to desiccation between springtails and insects is the fact that the former is protected only by the blastodermal cuticle, while the later has the cumulative protection of both chorion and serosal cuticle. In this sense, one can speculate that the evolution of a more elastic (i.e. less stiffen) chorion in the insect lineage allowed the eggs to expand their volume due to water uptake without rupturing the chorion, as it occurs in springtails. Apart from a small period in their embryogenesis, the springtail egg is protected by only one type of layer: the chorion or the blastodermal cuticle. Due their more elastic chorion, insect eggs produce a serosal cuticle while maintaining their chorion, thus allowing them to be protected by both types of layers at the same time. This might have been relevant to allow eggs to expand their niches to more dry habitats, while springtails are still largely confined to cryptozoic ones. This idea that the physiological unit that protects insect eggs against water loss is the chorion in addition to the serosal cuticle was put forward by Beckel (1958). Molecularly, this could be explained by alterations in the timing of chorion sclerotization that occurs in insect eggshells (and most likely also in springtails), making it stiffer. Accordingly, hampering this pathway lead the insect egg to have a lower protection against water loss (Dias *et al.*, 2013) or a chorion burst, due to the excessive water uptake (Wu *et al.*, 2013).

In any case, the distinct degrees of egg resistance to desiccation described here are consistent with the specific microhabitats occupied by each springtail species. *Orchesella cincta* is found in the upper levels of the litter (i.e. an environment less humid than the soil) and also on the twigs of trees (Hopkin, 1997). *Folsomia candida* is found into the humus layer (i.e. within the soil), a

zone that usually has 100% relative humidity (Waagner *et al.*, 2011). In fact, when adults are compared, *O. cincta* exhibits a greater resistance to desiccation than that presented by *F. candida* (Kærsgaard *et al.*, 2004). In addition, *F. candida* ceases to lay eggs when its surrounding relative humidity falls from 100 to 98.8% (Waagner *et al.*, 2011). Therefore, *F. candida* adults are sensitive to water loss and their eggs present a comparatively mild desiccation resistance, and thus, for both embryonic and post-embryonic life stages, the permanence in environments with low relative humidities becomes impracticable.

Finally, the results described here enable us to speculate a possible terrestrialization scenario. The soil (or other interstitial spaces) might have been the route for hexapod land colonization (Dunlop *et al.*, 2013; Hopkin, 1997). In this hypothesis a gradual process of land colonization happened: the first terrestrial hexapods were very desiccation sensitive and lived in moist soils. Those that acquired traits to hamper water loss could go above the soil and live in the litter or any other epidaphic environment. From there, the groups that acquired further traits to withstand even harsher desiccating conditions could leave the epidaphic environment and conquer even dryer niches.

### **Concluding remarks**

The main role of the eggshell is to protect the developing embryo. During Tetrapoda evolution, for example, a calcified eggshell was essential to minimize water loss and to conquer the land (Dunlop *et al.*, 2013). The role of the blastodermal cuticle in springtail egg resistance to desiccation is similar to the function undertaken by the serosal cuticle in insect eggs. Given that the blastodermal cuticle is present in other arthropod groups (Rezende *et al.* 2016) we envisage that the production of this structure in aquatic ancestors was an important prerequisite for the evolutionary process of Hexapoda terrestrialization. After the split of springtail and insect lineages, the insects evolved for the acquisition of two extraembryonic epithelia (amnion and serosa), an amniotic cavity and a serosal cuticle (Machida and Ando, 1998; Panfilio, 2008; Rezende *et al.*, 2016). As previously suggested (Jacobs *et al.*, 2013; Zeh *et al.*, 1989), the presence of a chorion that does not rupture, a serosal cuticle,

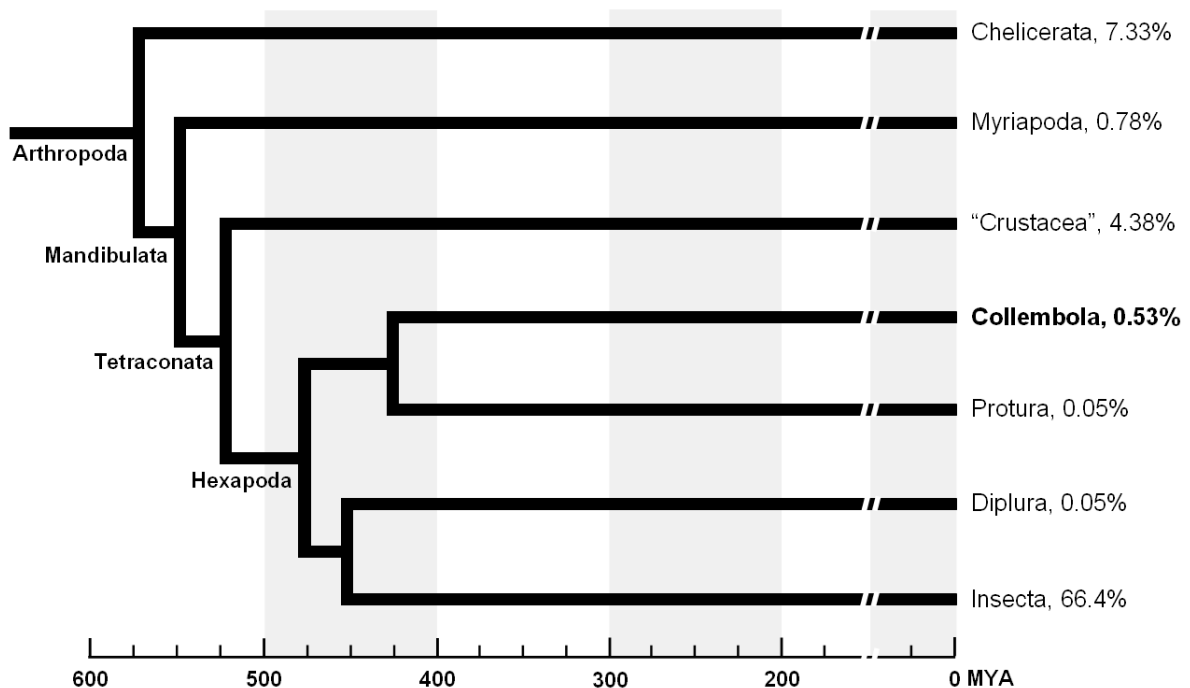
two extraembryonic tissues and an amniotic cavity ensured the insects with the possibility to exploit new niches and attain an adaptive success that has no parallel among other arthropods and even other animals.

## Acknowledgments

This study was financed by CAPES and FAPERJ. H.C.M.V. was supported by a fellowship from the Brazilian Federal Agency, CAPES (88881.132450/2016-01). The authors are also indebted to Janine Mariën for technical assistance.

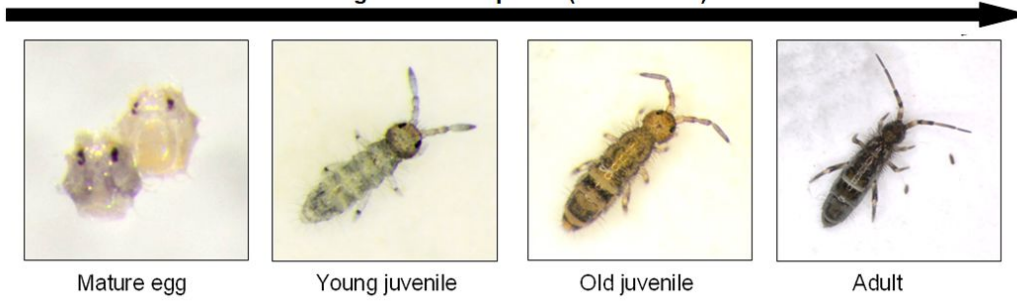
## Supplementary material

**Supplementary Figure 1: Arthropod phylogeny with estimates on time of divergence and number of species.** The divergence periods indicated are the median time estimated at timetree.org (accessed on 27/03/2019). Values alongside each terminal taxon indicates the percentage of species regarding the total number of living animal species, estimated as 1,527,660 (Zhang 2011).



**Supplementary Figure 2: Background information for *Orchesella cincta*.**

Stages of development (not in scale):



Mature egg

Young juvenile

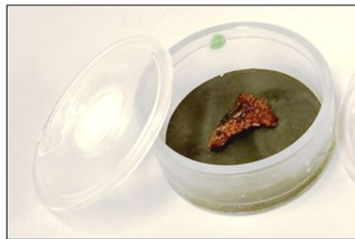
Old juvenile

Adult

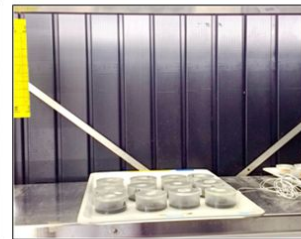
Some rearing conditions:



Twigs

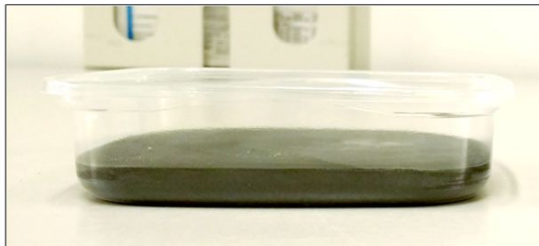


Jar with bark



Tray with jars in the hood

**Supplementary Figure 3: Some rearing conditions for *Foslomia candida*.**



Jar with plaster of Paris and charcoal

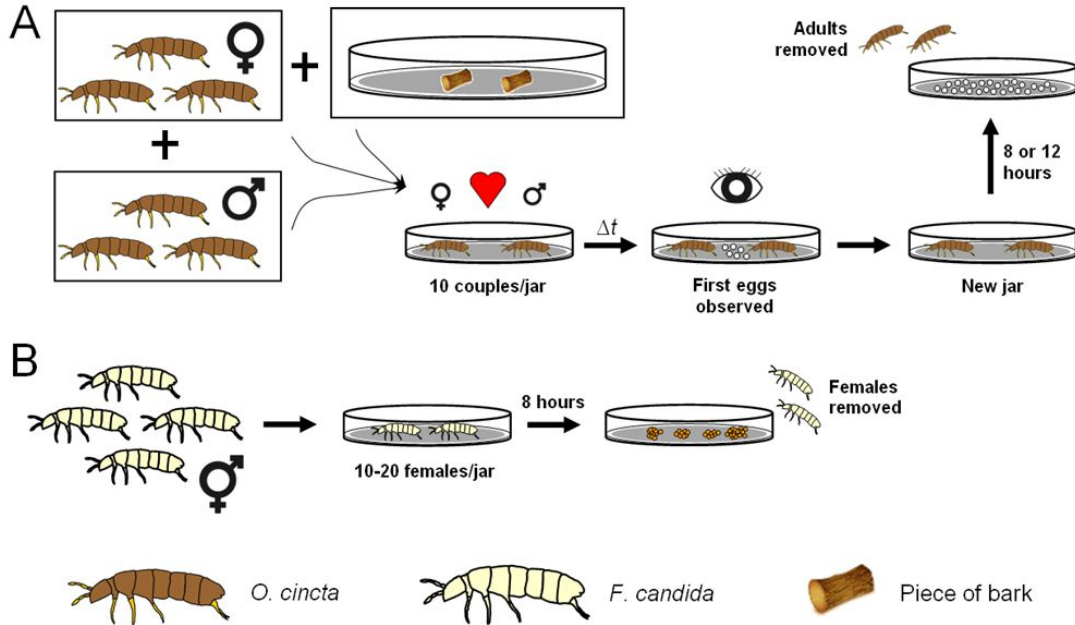


Large jar with adults

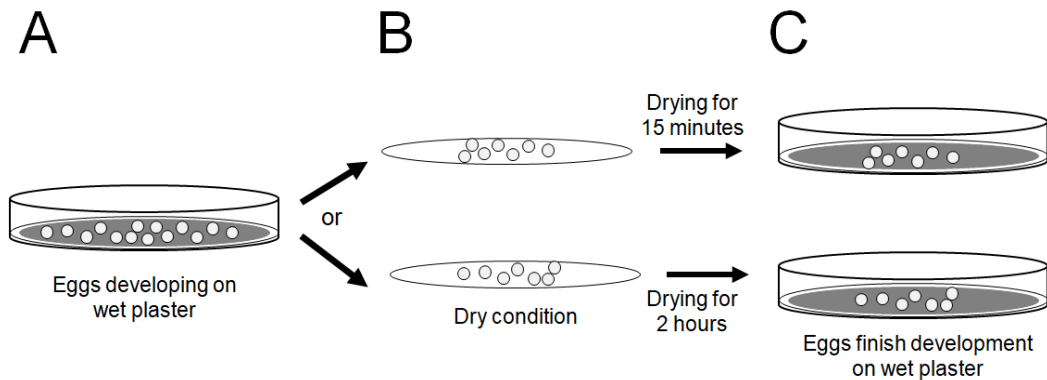


Jars in the hood

**Supplementary Figure 4: Scheme of *O. cincta* and *F. candida* egg laying.** (A) *O. cincta* adults were sexed and transferred to small jars containing a piece of bark. Jars were carefully observed to check the presence of the first eggs. Adults were then transferred to a new jar where egg laying lasted for 8 or 12 hours, when adults were removed. (B) Parthenogenetic *F. candida* females were transferred for small jars, where egg laying lasted for 8 hours, when females were removed.



**Supplementary Figure 5: Methodology for the egg viability assay.** The procedure was the same for *O. cincta* and *F. candida*. (A) Eggs are developing on wet plaster until the desired stage is reached. (B) Eggs were then left air-drying for two different periods: 15 minutes or 2 hours. (C) After these periods were completed, eggs were returned to wet plaster until the completion of embryogenesis, when hatching rates were scored. Controls were left on wet plaster throughout the whole embryogenesis (not shown).





## 6. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A fase embrionária é uma das mais importantes e também susceptíveis do ciclo de vida de um organismo. O sucesso do seu desenvolvimento é essencial para garantir a sobrevivência e permanência das espécies. Os metazoários apresentam distintos padrões reprodutivos. Os principais deles são: ovulíparidade que consiste na fertilização externa na qual os gametas são liberados em ambiente aquático e os embriões desenvolvem-se sem cuidado parental; a oviparidade que consiste de um padrão reprodutivo no qual ocorre fertilização interna e as fêmeas depositam ovos fertilizados no ambiente; a oviparidade com retenção de ovos que consiste na retenção de ovos pelas fêmeas que apenas os ovipõem em estágio final do desenvolvimento embrionário; e a viviparidade que garante maior proteção a prole, uma vez que, o embrião desenvolve-se no interior do corpo da fêmea alocado no trato reprodutivo ou na cavidade corporal (Blackburn, 1999; Lodé, 2012).

A oviparidade se faz presente na maior parte dos grupos que adentraram o ambiente terrestre, porém nesta forma reprodutiva os embriões ficam mais susceptíveis a predação, desidratação, luz ultravioleta e variação de temperatura (Blackburn, 1999). Quando observamos dois grupos de animais que colonizaram a terra com sucesso, tetrápodos e artrópodes, notamos que ambos minimizaram os riscos da predação de seus embriões através do desenvolvimento de membranas e de cascas de ovos bem estruturadas (Little, 1983).

Os vertebrados terrestres consistem no grupo tetrápoda que colonizou a terra durante o período Devoniano (Little, 1983). Os tetrápodos dividem-se entre Amphibia, que inclui salamandras, sapos e cobra cega; e Amniota, formado por mamíferos, tartarugas, lagartos, crocodilos e aves (tetrápodos amniotas). Amphibia e Amniota divergiram a aproximadamente 350-300 milhões de anos (Clack, 2016).

Apesar de serem descritos como animais terrestres, os anfíbios tem seu ciclo de vida fortemente associado/limitado ao meio aquático ou extremamente úmido. Isso se deve a presença de uma pele permeável e aos ovos que são depositados em água (Sues, 2016). A estrutura dos ovos deste grupo é simples e compreende apenas de uma membrana vitelínica (também chamada de

córion) que circundam o zigoto em desenvolvimento e uma (ou mais de uma) membrana gelatinosa. Estas estruturas têm relevância na proteção mecânica do embrião e servem para evitar uma possível entrada de água em excesso. Contudo, elas não são capazes de prevenir a perda de água o que limita os ovos de anfíbios ao ambiente aquático (Little, 1983).

Já os amniotas, dentre os tetrápodos, foram o grupo que melhor conquistou a independência do meio aquático graças a uma fecundação interna e a formação do ovo amniótico que apresenta cascas e membranas extraembrionárias que protegem o embrião em desenvolvimento (Clack, 2016; Little, 1983; Sues, 2016). Dentre as aves e répteis, de maneira geral, o embrião é protegido por uma membrana vitelínica, uma rica camada de albumina e duas camadas membranosas. Além disso, esses ovos apresentam uma camada de casca calcárea que garante uma proteção física e também garante a troca gasosa e controla o fluxo de água (Hincke *et al.*, 2012; Little, 1983).

No caso dos artrópodes, uma maior proteção dos ovos também está associada com a colonização do ambiente terrestre (Zeh *et al.*, 1989). Os crustáceos ditos terrestres (Isopoda, Decapoda, Amphipoda e Ostracoda) apresentam como estratégia de proteção dos ovos a internalização dos mesmo no corpo das fêmeas o que garante o desenvolvimento (Little, 1983; Rehm *et al.*, 2009; Warburg, 1993). Em Chelicerata, a proteção dos ovos está associada a produção de estruturas extra corpóreas como ocorre, por exemplo, entre os aracnídeos: os ovos produzidos pelas fêmeas neste grupo se desenvolvem dentro de casulos de seda que garantem a proteção; no caso dos ácaros, as fêmeas secretam, quando os ovos são postos, uma camada bem estruturada e rica em cera, o que garante a proteção contra a perda de água (Little, 1983). Já nos insetos, a proteção dos ovos, de maneira geral, está associada a inovações que ocorreram nesse grupo, a saber: a formação de camadas de casca bem estruturadas, de origem materna e de origem pós-zigótica, além da existência de dois tecidos extra-embriônicos - âmnio e serosa - e de uma cavidade amniótica. Todas essas inovações permitiram a permanência e expansão dos insetos no ambiente terrestre, bem como contribuíram para a irradiação do grupo (Little, 1983; Panfilio, 2008; Zeh *et al.*, 1989).

Neste trabalho, foi discutida a relevância da parte da casca dos ovos de origem pós-zigótica – as cutículas serosa e blastodermal - no sucesso dos

hexápodos no geral, e em particular dos insetos, na conquista do ambiente terrestre. Focou-se em estudar as bases moleculares de sua composição, no caso da cutícula serosa e na vertente fisiológica no caso da cutícula blastodermal.

No primeiro capítulo desta tese foi descrito temporalmente o momento exato de formação da cutícula serosa no besouro *T. castaneum* à 30 °C. Apesar de ter sua função descrita (Jacobs *et al.*, 2013) não existem relatos na literatura sobre o estágio de formação desta estrutura para esta espécie. A etapa de formação da cutícula serosa de *T. castaneum*, quando se considera o percentual de embriogênese, assemelha-se ao que é descritos para outras espécies de insetos (Dorn *et al.*, 1987; Farnesi *et al.*, 2017; Lagueux *et al.*, 1979; Rezende *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2014) o que aponta para uma possível conservação do estágio de formação da cutícula serosa dentro dos insetos. Ainda dentro do primeiro capítulo, descrevemos a relevância do gene *Tc-elovl04*, que codifica uma elongase, para a proteção dos ovos contra a perda de água assim como ocorre em outras fases do estágio de vida de insetos. No entanto, não fomos capazes de comprovar qual biomolécula é afetada diretamente pelo seu silenciamento e se esta compõem as camadas maternas da casca ou da cutícula serosa. Contudo, evidências na literatura apontam para a possível ação de hidrocarbonetos para a impermeabilização (vide Apêndice A).

Nas ninfas de *N. lugens*, quatro genes *elovl*, NiELO 2, 3, 8 e 16, o aumento da permeabilidade cuticular está associada ao perfil de hidrocarbonetos cuticulares. A quantidade média de alcanos totais quantificados por miligrama de massa corporal da ninfa foi de 105 ng/mg em ninfas controle e 39, 51, 76 e 54 ng/mg em ninfas silenciadas para NiELO 2, 3, 8 e 16, respectivamente (Li *et al.*, 2019). As elongases participam da formação dos metabólitos iniciais da via de síntese de hidrocarbonetos (vide Introdução do Capítulo 1).

Os hidrocarbonetos cuticulares dos insetos adultos são sintetizados nos oenócitos, células poliplóides de origem ectodérmica que tem papel essencial para o metabolismo de lipídeos (Martins e Ramalho-Ortigão, 2012). Nos ovos de insetos, durante o estágio de formação da cutícula serosa, ainda não existem oenócitos formados. A síntese de hidrocarbonetos, durante a fase

inicial da embriogênese, seria realizada provavelmente pelas células da serosa. Além de sintetizar a sua cutícula, a serosa desempenha múltiplas funções relevantes para o desenvolvimento, como atuar no catabolismo do vitelo (Lamer e Dorn, 2001) e no sistema imune inato do embrião (Berger-Twelbeck *et al.*, 2003; Gorman *et al.*, 2004; Jacobs e van der Zee, 2013). Estes dados mostram que a serosa, como tecido extra-embrionário, apresenta relevância similar as membranas extra-embrionárias encontradas em ovos de vertebrados amniotas.

No segundo capítulo desta tese, foi descrito o tempo de desenvolvimento embrionário e o processo de formação da cutícula blastodermal durante a embriogênese de duas espécies de hexápodos não-insetos, *O. cincta* que vive na serrapilheira e *F. candida* que vive no solo. Apesar da diferença de nicho, ambas as espécies produzem uma cutícula blastodermal e são capazes de resistir ao seco após a formação desta. Contudo, ovos de *F. candida* mostraram uma baixa resistência à exposição ao seco quando comparado com os ovos de *O. cincta*.

De toda forma, nossos dados demonstram similaridade funcional da cutícula serosa dos insetos com a cutícula blastodermal de colêmbolos. Ocorre uma heterocronia para o processo de formação dessas cutículas: em colêmbolas, a cutícula blastodermal é formada pelo blastoderma celular enquanto em insetos a cutícula serosa é formada no início da gastrulação, ou seja, em estágio da embriogênese posterior ao estágio do blastoderma celular. Curiosamente, apesar dessa diferença no estágio embrionário, ambas as cutículas são formadas aproximadamente no mesmo percentual de embriogênese: 15 - 22% em colêmbolos e 15 - 27% em insetos. Além de apresentarem função similar, acreditamos que a via de síntese da cutícula blastodermal é similar a cutícula serosa, contendo quitina e provavelmente lipídeos ou seus derivados em que, possivelmente, os genes *elongases* estariam envolvidos neste processo.

Algumas lacunas sobre o processo de formação das cutículas serosa e blastodermal ainda precisam ser esclarecidas. Como perspectivas visa-se confirmar a presença de hidrocarbonetos na cutícula serosa (o que já começamos a realizar em colaboração com Dr. Fábio Nascimento; vide Apêndice A), descrever a composição da cutícula blastodermal, além de definir

os genes envolvidos em sua formação. Em relação à esse último ponto, já foram obtidos dados de transcriptoma de ovos de *F. candida* em diferentes momentos da embriogênese e os mesmos estão sendo analisados em colaboração com o grupo do Dr. Dick Roelofs.

## 7. CONCLUSÃO

1. Em *T. castaneum* a cutícula serosa é sintetizada com 16% de embriogênese, a 30 °C.
2. O RNAi para *Tc-zen1* acarreta fenótipo letal em ovos de *T. castaneum* na cepa Georgia.
3. O gene *Tc-elovl02*, quando silenciado, acarreta em baixa viabilidade independente da umidade relativa.
4. Além de *Tc-elovl01*, *02*, *03* e *04*, outras duas elongases, *Tc-elovl05* e *06* são expressas durante a embriogênese inicial de *T. castaneum*.
5. O silenciamento gênico de *Tc-elovl04* afeta a viabilidade dos ovos expostos a baixa umidade relativa, confirmando a nossa hipótese original.
6. Ovos de *O. cincta* são mais resistentes à dessecação do que os ovos de *F. candida*.
7. Cutículas blastodermis de colêmbolos possuem a mesma função que cutículas serosas de insetos: proteger ovos contra a perda de água.
8. Cutículas blastodermis e serosas são produzidas em momentos (percentuais) similares de embriogênese.
9. A presença de uma cutícula pós-zigótica protetora é ancestral dentre os hexápodos e provavelmente contribui para a terrestrialização desse grupo.

## REFERÊNCIAS

- Agamennone, V., Jakupović, D., Weedon, J.T., Suring, W.J., Van Straalen, N.M., Roelofs, D., Oling, W.F.M.R., 2015. The microbiome of *Folsomia candida*: an assessment of bacterial diversity in a Wolbachia-containing animal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 128. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv128>.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>.
- Anderson, D.T., 1973. *Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods*. Pergamon Press, Oxford. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-05626-5>.
- Aranda, M., Marques-Souza, H., Bayer, T., Tautz, D., 2008. The role of the segmentation gene hairy in *Tribolium*. *Dev. Genes Evol.* <https://doi.org/10.1007/s00427-008-0240-1>.
- Bayley, M., 1999. Water vapor absorption in Arthropods by accumulation of Myoinositol and Glucose. *Science* 80, 285, 1909–1911. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1909>.
- Beament, J.W.L., 1949. The Penetration of Insect Egg-shells: II.—The Properties and Permeability of Sub-chorial Membranes during Development of *Rhodnius prolixus*, Stål. *Bull. Entomol. Res.* 39, 467. <https://doi.org/10.1017/S0007485300022574>.
- Beckel, W.E., 1958. Investigations of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* DYAR. *Can. J. Zool.* 36, 541–554. <https://doi.org/10.1139/z58-050>.
- Benton, M.A., Akam, M., Pavlopoulos, A., 2013. Cell and tissue dynamics during *Tribolium* embryogenesis revealed by versatile fluorescence labeling approaches. *Development* 140, 3210–3220. <https://doi.org/10.1242/dev.096271>.
- Berger-Twelbeck, P., Hofmeister, P., Emmling, S., Dorn, A., 2003. Ovicide-induced serosa degeneration and its impact on embryonic development in *Manduca sexta* (Insecta: Lepidoptera). *Tissue Cell* 35, 101–112. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(03\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(03)00009-0).
- Blackburn, D.G., 1999. Viviparity and oviparity - Evolution and strategies. *Encycl. Reprod.* Vol. 4 4, 994–1003.
- Bond, L.M., Miyazaki, M., O'Neill, L.M., Ding, F., Ntambi, J.M., 2016. Fatty Acid Desaturation and Elongation in Mammals, in: Ridgway, N.D., McLeod, R.S. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, p. 185–208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00006-7>.
- Bretfeld, G., 1963. *Zur Anatomie und Embryologie der Rumpfmuskuolatur und der abdominalen Anhänge der Collembolen*. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Briti, N.W., 1951. Observations on the Life History of the Collembolan *Achorutes armatus*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 70, 119–132. <https://doi.org/10.2307/3223425>.
- Brown, S.J., Patel, N.H., Denell, R.E., 1994. Embryonic expression of the single *Tribolium* engrailed homolog. *Dev. Genet.* 15, 7–18. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020150103>.
- Brown, S.J., Shippy, T.D., Miller, S., Bolognesi, R., Beeman, R.W., Lorenzen, M.D., Bucher, G., Wimmer, E.A., Klingler, M., 2009. *The Red Flour Beetle, Tribolium castaneum* (Coleoptera): A Model for Studies of Development

- and Pest Biology. Cold Spring Harb. Protoc. 2009, pdb.emo126-pdb.emo126. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo126>.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2003. Invertebrates, Second. ed. Sinauer Associates.
- Bucher, G., 2009. The Beetle Book.
- Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M., 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.* 12, R85-6.
- Cameron, D.J., Tong, Z., Yang, Z., Kaminoh, J., Kamiyah, S., Chen, H., Zeng, J., Chen, Y., Luo, L., Zhang, K., 2007. Essential role of Elov14 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 111–9.
- Cardozo, M.L., 2017. Padrões de expressão de diferentes isoformas do gene *rainyhead* em ovos do besouro *Tribolium castaneum*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Chapman, R.F., Simpson, S.J., Douglas, A.E., 2013. The insects : structure and function, 5 edition. ed. Cambridge University Press.
- Chaudhari, S.S., Noh, M.Y., Moussian, B., Specht, C.A., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., 2015. Knickkopf and retroactive proteins are required for formation of laminar serosal procuticle during embryonic development of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 60, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2015.02.013>.
- Chertemps, T., Dupontets, L., Labeur, C., Ueda, R., Takahashi, K., Saigo, K., Wicker-Thomas, C., 2007. A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 4273–4278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608142104>.
- Chou, K.C., Shen, H.-B., 2010. A New Method for Predicting the Subcellular Localization of Eukaryotic Proteins with Both Single and Multiple Sites: Euk-mPLoc 2.0. *PLoS One* 5, e9931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009931>.
- Christiansen, K., 1964. Bionomics of Collembola. *Annu. Rev. Entomol.* 9, 147–178. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.09.010164.001051>.
- Clack, J.A., 2016. Land Vertebrates, the Origin and Evolution of. *Encycl. Evol. Biol.* 2, 296–304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00276-6>.
- Clements, A.N., 1992. Biology of Mosquitoes: Development Nutrition and Reproduction, 1o ed. Springer Netherlands.
- Crawford, C.S., 1992. Millipedes as Model Detritivores. *Berichte des Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereins Innsbruck Suppl.* 10, 277–288.
- Dawson, P.S., 1977. Life History Strategy and Evolutionary History of *Tribolium* Flour Beetles. *Evolution* (N. Y). 31, 226–229. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1977.tb01001.x>.
- de Andrade, E.C., Hunter, W.B., 2016. RNA Interference – Natural Gene-Based Technology for Highly Specific Pest Control (HiSPeC), in: RNA Interference. InTech. <https://doi.org/10.5772/61612>.
- de Souza, T.M., 2014. Análise temporal da formação da cutícula serosa e da expressão do gene *rainyhead* na embriogênese inicial do besouro *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) Campos dos Goytacazes Janeiro de. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Dias, F.A., Gandara, A.C.P., Queiroz-Barros, F.G., Oliveira, R.L.L., Sorgine,



- M.H.F., Braz, G.R.C., Oliveira, P.L., 2013. Ovarian dual oxidase (Duox) activity is essential for insect eggshell hardening and waterproofing. *J. Biol. Chem.* 288, 35058–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522201>.
- Dickinson, M., 2018. The impacts of heat-wave conditions on reproduction in a model insect, *Tribolium castaneum*. University of East Anglia.
- Dong, X., Li, Q., Zhang, H., 2015. The noa gene is functionally linked to the activation of the Toll/Imd signaling pathways in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Dev. Comp. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.09.009>.
- Dorn, A., Bishoff, S.T., Gilbert, L.I., 1987. An incremental analysis of the embryonic development of the tobacco hornworm, *manduca sexta*. *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* 11, 137–157. <https://doi.org/10.1080/01688170.1987.10510274>.
- Dunlop, J.A., Scholtz, G., Selden, P.A., 2013. Water-to-Land Transitions, in: *Arthropod Biology and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 417–439. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-36160-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36160-9_16).
- Edney, E.B., 1977. *Water Balance in Land Arthropods, Zoophysiology and Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-81105-0>.
- Faddeeva-Vakhrusheva, A., Derks, M.F.L., Anvar, S.Y., Agamennone, V., Suring, W., Smit, S., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2016. Gene family evolution reflects adaptation to soil environmental stressors in the genome of the collembolan *Orchesella cincta*. *Genome Biol. Evol.* 8, 2106–2117. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw134>.
- Faddeeva-Vakhrusheva, A., Kraaijeveld, K., Derks, M.F.L., Anvar, S.Y., Agamennone, V., Suring, W., Kampfraath, A.A., Eilers, J., Le Ngoc, G., van Gestel, C.A.M., Mariën, J., Smit, S., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2017. Coping with living in the soil: The genome of the parthenogenetic springtail *Folsomia candida*. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3852-x>.
- Farnesi, L.C., Menna-Barreto, R.F.S., Martins, A.J., Valle, D., Rezende, G.L., 2015. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J. Insect Physiol.* 83, 43–52. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2015.10.006>.
- Farnesi, L.C., Vargas, H.C.M., Valle, D., Rezende, G.L., 2017. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0006063. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063>.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>.
- Fountain, M.T., Hopkin, S.P., 2005. *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 201–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130331>.
- Futahashi, R., Yamahama, Y., Kawaguchi, M., Mori, N., Ishii, D., Okude, G., Hirai, Y., Kawahara-Miki, R., Yoshitake, K., Yajima, S., Hariyama, T., Fukatsu, T., 2019. Molecular basis of wax-based color change and UV reflection in dragonflies. *Elife* 8, 1–24. <https://doi.org/10.7554/elife.43045>.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: Walker, J.M. (Org.), The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, NJ, p. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>.
- Gilles, A.F., Schinko, J.B., Averof, M., 2015. Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. Development 142, 2832–9. <https://doi.org/10.1242/dev.125054>.
- Ginzel, M.D., Blomquist, G.J., 2016. Insect Hydrocarbons: Biochemistry and Chemical Ecology, in: Cohen, E., Moussian, B. (Orgs.), Extracellular Composite Matrices in Arthropods. Springer International Publishing, Cham, p. 221–252. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1_7).
- Giribet, G., Edgecombe, G.D., 2012. Reevaluating the Arthropod Tree of Life. Annu. Rev. Entomol. 57, 167–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100659>.
- Goltsev, Y., Rezende, G.L., Vranizan, K., Lanzaro, G., Valle, D., Levine, M., 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. Dev. Biol. 330, 462–470. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2009.02.038>.
- Good, N.E., 1936. The Flour Beetles of the Genus *Tribolium*. Tech. Bull.
- Gorman, M.J., Kankanala, P., Kanost, M.R., 2004. Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco hornworm eggs. Insect Mol. Biol. 13, 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00454.x>.
- Greenslade, P., 1981. Survival of Collembola in arid environments: Observations in South Australia and the Sudan. J. Arid Environ. 4, 219–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(18\)31563-5](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(18)31563-5).
- Grimaldi, D., Engel, M.S., 2005. Evolution of the Insects. Cambridge University Press.
- Guillou, H., Zadravec, D., Martin, P.G.P., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. Prog. Lipid Res. 49, 186–199. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2009.12.002>.
- Gurska, D., Vargas Jentsch, I.M., Panfilio, K.A., 2019. Mutual regulation underlies paralogue functional diversification. bioRxiv 427245. <https://doi.org/10.1101/427245>.
- Hadley, N.F., 1994. Water relations of terrestrial arthropods. Academic Press.
- Hadley, N.F., 1980. Surface Waxes Permeability and Integumentary Lipids deposited on or associated with the surface of. Am. Sci. 68, 546–553.
- Handel, K., Grünfelder, C.G., Roth, S., Sander, K., 2000. *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. Dev. Genes Evol. 210, 167–79. <https://doi.org/10.1007/s004270050301>.
- Hartley, J.C., 1962. The egg of *Tetrix* (Tetrigidae, Orthoptera), with a discussion on the probable significance of the anterior horn. Q. J. Microsc. Sci. 3, 253–259.
- Haslam, T.M., Kunst, L., 2013. Extending The Story Of Very-Long-Chain Fatty Acid Elongation. Plant Sci. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.05.008>.
- Higashi, M., Abe, T., Burns, T.P., 1992. Carbon-nitrogen balance and termite ecology. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 249, 303–308.

- <https://doi.org/10.1098/rspb.1992.0119>.
- Hincke, M.T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A.B., McKee, M.D., 2012. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 1266–80.
- Hinton, H.E., 1942. Secondary sexual characters of *Tribolium*. *Nature* 149, 500–501. <https://doi.org/10.1038/149500b0>.
- Hopkin, S.P., 1997. *Biology of the springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1017/s0022112003005330>.
- Jacobs, C.G.C., Rezende, G.L., Lamers, G.E.M., van der Zee, M., 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proceedings. Biol. Sci.* 280, 20131082. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1082>.
- Jacobs, C.G.C., van der Zee, M., 2013. Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.017>.
- Jahn, T.L., 1935. Nature and Permeability of Grasshopper Egg Membranes. II. Chemical Composition of Membranes. *Exp. Biol. Med.* 33, 159–163. <https://doi.org/10.3181/00379727-33-8290C>.
- Jakobsson, A., Westerberg, R., Jacobsson, A., 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 45, 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004>.
- Joose, E.N.G., Veld, C.J., Brugman, F.A., 1972. The Effects of Constant and Fluctuating Temperatures On the Production of Spermatophores and Eggs in Populations of *Orchesella cincta* (Linné), (Collembola, Entomobryidae). *Netherlands J. Zool.* 23, 488–502. <https://doi.org/10.1163/002829673X00058>.
- Jung, A., Hollmann, M., Schäfer, M.A., 2007. The fatty acid elongase NOA is necessary for viability and has a somatic role in *Drosophila* sperm development. *J. Cell Sci.* 120, 2924–34. <https://doi.org/10.1242/jcs.006551>.
- Jura, C., 1972. Development of apterygote insects, in: Counce, S., Waddington, C.H. (Orgs.), *Developmental systems: insects*. Academic Press, London, p. 49–94.
- Jura, Czeslaw, Krzysztofowicz, A., Kisiel, E., 1987. Embryonic development of *Tetrodontophora bielensis* (Collembola): Descriptive, with Scanning electron micrographs, in: Ando, H., Jura, C (Orgs.), *Recent Advances in Insect Embryology in Japan and Poland*. *Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, p. 77–124.
- Kærsgaard, C.W., Holmstrup, M., Malte, H., Bayley, M., 2004. The importance of cuticular permeability, osmolyte production and body size for the desiccation resistance of nine species of Collembola. *J. Insect Physiol.* 50, 5–15. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2003.09.003>.
- Klahre, U., Crete, P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A., Meins, F., 2002. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11981–11986. <https://doi.org/10.1073/pnas.182204199>.
- Klowden, M.J., 2013. *Physiological Systems in Insects*, 3rd ed. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04120-0>.
- Knoll, A.H., Nowak, M.A., 2017. The timetable of evolution. *Sci. Adv.* 3, e1603076. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603076>.
- Konopova, B., Akam, M., 2014. The Hox genes Ultrabithorax and abdominal-A

- specify three different types of abdominal appendage in the springtail *Orchesella cincta* (Collembola). *Evodevo* 5, 2. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-2>.
- Kukalová-Peck, J., 1987. New Carboniferous Diplura, Monura, and Thysanura, the hexapod ground plan, and the role of thoracic side lobes in the origin of wings (Insecta). *Can. J. Zool.* 65, 2327–2345. <https://doi.org/10.1139/z87-352>.
- Lagueux, M., Hetru, C., Goltzene, F., Kappler, C., Hoffmann, J.A., 1979. Ecdysone titre and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 25, 709–723. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(79\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(79)90123-9).
- Lamer, A., Dorn, A., 2001. The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. *Tissue Cell* 33, 580–595. <https://doi.org/10.1054/tice.2001.0213>.
- Larink, O., Biliński, S.M., 1989. Fine structure of the egg envelopes of one proturan and two Collembolan genera (apterygota). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 18, 39–45. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(89\)90034-2](https://doi.org/10.1016/0020-7322(89)90034-2).
- Legg, D.A., 2013. The impact of fossils on arthropod phylogeny. *Imp. Coll. London. Imperial College London.* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H., Huang, Y.-S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43, 36–54.
- Li, D.-T., Chen, X., Wang, X.-Q., Moussian, B., Zhang, C.-X., 2019. The fatty acid elongase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.03.005>.
- Liefting, M., Weerenbeck, M., Van Dooremalen, C., Ellers, J., 2010. Temperature-induced plasticity in egg size and resistance of eggs to temperature stress in a soil arthropod. *Funct. Ecol.* 24, 1291–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01732.x>.
- Lillywhite, H.B., 2006. Water relations of tetrapod integument. *J. Exp. Biol.* 209, 202–226. <https://doi.org/10.1242/jeb.02007>.
- Linz, D.M., Clark-Hachtel, C.M., Borràs-Castells, F., Tomoyasu, Y., 2014. Larval RNA Interference in the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Vis. Exp.* 1–8. <https://doi.org/10.3791/52059>.
- Little, C., 1983. The colonisation of land: origins and adaptations of terrestrial animals. Cambridge University Press.
- Lodé, T., 2012. Oviparity or viviparity? That is the question... *Reprod. Biol.* 12, 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2012.09.001>.
- Lorenzen, M.D., Brown, S.J., Denell, R.E., Beeman, R.W., 2002. Cloning and characterization of the *Tribolium castaneum* eye-color genes encoding tryptophan oxygenase and kynurenine 3-monooxygenase. *Genetics* 160, 225–234.
- Lorini, I., Krzyzanowski, F.C., De Barros, J., Ademir, F.-N., Henning, A., Henning, F.A., 2015. Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas, 1o ed. Embrapa, Brasília.
- Lozano-Fernandez, J., Carton, R., Tanner, A.R., Puttick, M.N., Blaxter, M., Vinther, J., Olesen, J., Giribet, G., Edgecombe, G.D., Pisani, D., 2016. A molecular palaeobiological exploration of arthropod terrestrialization. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150133.

- <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0133>.
- Machida, R., 2006. Evidence from embryology for reconstructing the relationships of hexapod basal clades. *Arthropod Syst. Phylogeny* 64, 95–104. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61027-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61027-6).
- Machida, R., Ando, H., 1998. Evolutionary changes in developmental potentials of the embryo proper and embryonic membranes along with the derivative structures in Atelocerata, with special reference to Hexapoda (Arthropoda). *Proc. Arthropodan Embryol. Soc. Japan* 33, 1–13.
- Maia, I. de G., 2013. Histórico, in: Pereira, T.C. (Org.), *Introdução à técnica de Interferência por RNA - RNAi*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 1–14.
- Marshall, V.G., Kevan, D.K.M., 1962. Preliminary Observations on the Biology of *Folsomia candida* Willem, 1902 (Collembola: Isotomidae). *Can. Entomol.* 94, 575–586. <https://doi.org/10.4039/Ent94575-6>.
- Martins, G., Ramalho-Ortigão, J., 2012. Oenocytes in insects. *Invertebr. Surviv. J.* 9, 139–152.
- Marx, M.T., Guhmann, P., Decker, P., 2012. Adaptations and Predispositions of Different Middle European Arthropod Taxa (Collembola, Araneae, Chilopoda, Diplopoda) to Flooding and Drought Conditions. *Anim. an open access J. from MDPI* 2, 564–90. <https://doi.org/10.3390/ani2040564>.
- McFarlane, J.E., 1960. Structure and function of the egg shell as related to water absorption by the eggs of *Acheta domesticus* (L.). *Can. J. Zool.* 38, 231–241. <https://doi.org/10.1139/z60-029>.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>.
- Michalczyk, Ł., 2009. Sexual selection and reproductive compatibility in *Tribolium castaneum*. University of East Anglia.
- Michalczyk, Ł., Martin, O.Y., Millard, A.L., Emerson, B.C., Gage, M.J.G., 2010. Inbreeding depresses sperm competitiveness, but not fertilization or mating success in male *Tribolium castaneum*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 3483–3491. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0514>.
- Miller, S.C., Miyata, K., Brown, S.J., Tomoyasu, Y., 2012. Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047431>.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P.B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R.G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust *et al.* 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* (80-. ). 346, 763–767. <https://doi.org/10.1126/science.1257570>.
- Monnerat, A.T., Soares, M.J., Lima, J.B.P., Rosa-Freitas, M.G., Valle, D., 1999. Anopheles albittarsis eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J. Insect Physiol.* 45, 915–922. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00071-2).
- Monroig, Ó., Rotllant, J., Sánchez, E., Cerdá-Reverter, J.M., Tocher, D.R., 2009. Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 1093–1101. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2009.07.002>.

- Monroig, O., Webb, K., Ibarra-Castro, L., Holt, G.J., Tocher, D.R., 2011. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.024>.
- Morris, J.L., Puttick, M.N., Clark, J.W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C.H., Yang, Z., Schneider, H., Donoghue, P.C.J., 2018. The timescale of early land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E2274–E2283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719588115>.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279 LP – 289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 6. ed. ed. Artmed, Porto Alegre.
- Ng, W.C., Chin, J.S.R., Tan, K.J., Yew, J.Y., 2015. The fatty acid elongase Bond is essential. *Nat. Commun.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms9263>.
- Noh, M.Y., Beeman, R.W., Arakane, Y., 2012. RNAi-based functional genomics in *Tribolium castaneum* and possible application for controlling insect pests. *Entomol. Res.* 42, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2011.00437.x>.
- Nunes, F. de M.F., Simões, Z.L.P., 2013. Aplicações Biotecnológicas da RNAi em Animais, in: Pereira, T.C. (Org.), *Introdução à técnica de Interferência por RNA - RNAi*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 25–36.
- Palu, R.A.S., Chow, C.Y., 2018. Baldspot/ELOVL6 is a conserved modifier of disease and the ER stress response. *PLOS Genet.* 14, e1007557. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007557>.
- Panfilio, K.A., 2008. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev. Biol.* 313, 471–491. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.004>.
- Panfilio, K.A., Oberhofer, G., Roth, S., 2013. High plasticity in epithelial morphogenesis during insect dorsal closure. *Biol. Open* 2, 1108–1118. <https://doi.org/10.1242/bio.20136072>.
- Pauter, A.M., Olsson, P., Asadi, A., Herslöf, B., Csikasz, R.I., Zadavec, D., Jacobsson, A., 2014. Elovl2 ablation demonstrates that systemic DHA is endogenously produced and is essential for lipid homeostasis in mice. *J. Lipid Res.* 55, 718–728. <https://doi.org/10.1194/jlr.M046151>.
- Pereira, T.C., 2013. Moléculas Utilizadas em RNAi e Métodos de Obtenção, in: Pereira, T.C. (Org.), *Introdução à técnica de Interferência por RNA - RNAi*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 46–63.
- Pereira, T.C., Lopes-Cendes, I., 2013. Aplicações Médicas da RNAi, in: Pereira, T.C. (Org.), *Introdução à técnica de Interferência por RNA - RNAi*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 37–45.
- Prowazek, S., 1900. Bau und Entwicklung der Collembolen. *Arbeits fur Zool.* 12, 335–370.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W., Cunningham, C.W., 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* 463, 1079–1083. <https://doi.org/10.1038/nature08742>.

- Rehm, E.J., Hannibal, R.L., Chaw, R.C., Vargas-Vila, M.A., Patel, N.H., 2009. The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: A new model for arthropod development. Cold Spring Harb. Protoc. 4. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo114>.
- Rezende, G.L., 2008. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Instituto Oswaldo Cruz.
- Rezende, G.L., Martins, A.J., Gentile, C., Farnesi, L.C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A.A., Valle, D., 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. BMC Dev. Biol. 8, 82. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-82>.
- Rezende, G.L., Vargas, H.C.M., Moussian, B., Cohen, E., 2016. Composite Eggshell Matrices: Chorionic Layers and Sub-chorionic Cuticular Envelopes, in: Extracellular Composite Matrices in Arthropods. Springer International Publishing, Cham, p. 325–366. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1_9).
- Ribeiro, L., 2013. O GENE zelda E SEU PAPEL NA EMBRIOGÊNESE DO BESOURO MODELO *Tribolium castaneum*.
- Richards, S., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Brown, S.J., Denell, R., Beeman, R.W., Gibbs, R., Beeman, R.W., Brown, S.J., Bucher, G. *et al.* 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. Nature 452, 949–955. <https://doi.org/10.1038/nature06784>.
- Roelofs, D., Timmermans, M.J.T.N., Hensbergen, P., van Leeuwen, H., Koopman, J., Faddeeva, A., Suring, W., de Boer, T.E., Mariën, J., Boer, R., Bovenberg, R., van Straalen, N.M., 2013. A Functional Isopenicillin N Synthase in an Animal Genome. Mol. Biol. Evol. 30, 541–548. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss269>.
- Rota-Stabelli, O., Daley, A.C., Pisani, D., 2013. Molecular timetrees reveal a Cambrian colonization of land and a new scenario for ecdysozoan evolution. Curr. Biol. 23, 392–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.026>.
- Sassa, T., Kihara, A., 2014. Metabolism of Very Long-Chain Fatty Acids: Genes and Pathophysiology. Biomol. Ther. (Seoul). 22, 83–92. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.017>.
- Selden, P.A., 2016. Land Animals, Origins of, in: Encyclopedia of Evolutionary Biology. p. 288–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00273-0>.
- Shazali, M.E.H., Smith, R.H., 1986. Life history studies of externally feeding pests of stored sorghum: *Corcyra cephalonica* (Staint.) and *Tribolium castaneum* (Hbst). J. Stored Prod. Res. 22, 55–61. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(86\)90019-6](https://doi.org/10.1016/0022-474X(86)90019-6).
- Slifer, E.H., 1937. The origin and fate of the membranes surrounding the grasshopper egg, together with some experiments on the source of the hatching enzyme. Q. J. Microsc. Sci. 79, 493-U12.
- Sonnhammer, E.L., von Heijne, G., Krogh, A., 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. Proceedings. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 6, 175–82.
- Sterenborg, I., Roelofs, D., 2003. Field-selected cadmium tolerance in the springtail *Orchesella cincta* is correlated with increased metallothionein mRNA expression. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 741–747. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00070-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00070-5).
- Strobl, F., Stelzer, E.H.K., 2014. Non-invasive long-term fluorescence live

- imaging of *Tribolium castaneum* embryos. *Development* 141, 2331–2338. <https://doi.org/10.1242/dev.108795>.
- Sues, H.D., 2016. Amniotes, Diversification of. *Encycl. Evol. Biol.* 1, 56–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00279-1>.
- Szafer-Glusman, E., Giansanti, M.G., Nishihama, R., Bolival, B., Pringle, J., Gatti, M., Fuller, M.T., 2008. A Role for Very-Long-Chain Fatty Acids in Furrow Ingression during Cytokinesis in *Drosophila* Spermatocytes. *Curr. Biol.* 18, 1426–1431. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2008.08.061>.
- Tamarelle, M., 1981. La formation et l'évolution de l'organe dorsal chez les embryons de cinq collemboles (Insecta : Apterygota). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 10, 203–224. [https://doi.org/10.1016/S0020-7322\(81\)80009-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7322(81)80009-8).
- Tamm, J.C., 1986. Temperature-controlled under-water egg dormancy and postflood hatching in *Isotoma viridis* (Collembola) as forms of adaptation to annual long-term flooding. *Oecologia* 68, 241–245. <https://doi.org/10.1007/BF00384794>.
- Tamm, J.C., 1984. Surviving long submergence in the egg stage: a successful strategy of terrestrial arthropods living on flood plains (Collembola, Acari, Diptera). *Oecologia* 61, 417–419. <https://doi.org/10.1007/BF00379645>.
- Tamura, K., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kobayashi, T., Furihata, M., Chung, S., Ashida, S., Miki, T., Fujioka, T., Shuin, T., Nakamura, Y., Nakagawa, H., 2009. Novel Lipogenic Enzyme ELOVL7 Is Involved in Prostate Cancer Growth through Saturated Long-Chain Fatty Acid Metabolism. *Cancer Res.* 69, 8133–8140. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0775>.
- Tiegs, O.W., 1942. The “dorsal organ” of collembolan embryos. *Q. J. Microsc. Sci.* 83, 153–169.
- Tiegs, O.W., 1940. The Embryology and Affinities of the Symphyla s based on a Study of *Hanseniella agilis* Plates 1–9. *Q. J. Microsc. Sci.* 82, 208–225, pls. 1–9.
- Tomizuka, S., Machida, R., 2015. Embryonic development of a collembolan, *Tomocerus cuspidatus* Börner, 1909: With special reference to the development and developmental potential of serosa (Hexapoda: Collembola, Tomoceridae). *Arthropod Struct. Dev.* 44, 157–172. <https://doi.org/10.1016/J.ASD.2014.12.004>.
- Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., Bucher, G., 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: A genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.* 9, 1–22. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r10>.
- Uemiya, H., Ando, H., 1987. Blastodermic cuticles of a springtail, *Tomocerus ishibashii* Yosii (Collembola: Tomoceridae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 16, 287–294. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(87\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0020-7322(87)90001-8).
- van der Zee, M., Berns, N., Roth, S., 2005. Distinct Functions of the *Tribolium* zerknuilt Genes in Serosa Specification and Dorsal Closure. *Curr. Biol.* 15, 624–636. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.057>.
- Van Emden, H.F., 2013. *Handbook of agricultural entomology*. Wiley-Blackwell.
- van Straalen, N.M., Burghouts, T.B.A., Doornhof, M.J., Groot, G.M., Janssen, M.P.M., Joosse, E.N.G., van Meerendonk, J.H., Theeuwen, J.P.J.J., Verhoef, H.A., Zoomer, H.R., 1987. Efficiency of Lead and Cadmium Excretion in Populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from Various Contaminated Forest Soils. *J. Appl. Ecol.* 24, 953. <https://doi.org/10.2307/2403992>.



- Vargas, H.C.M., 2015. Caracterização da expressão de genes *elovl* na serosa de *Tribolium castaneum* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Vargas, H.C.M., Farnesi, L.C., Martins, A.J., Valle, D., Rezende, G.L., 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. J. Insect Physiol. 62, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.001>.
- Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem, N., Kim, S.Y., Mandal, M.N.A., Reddy, G.B., Bodepudi, R., Alderson, N.L., Brown, J.C., Hama, H., Dlugosz, A., Elias, P.M., Holleran, W.M., Ayyagari, R., 2007. Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ( $\geq$ C28) and the unique  $\omega$ -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. Hum. Mol. Genet. 16, 471–482. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl480>.
- Verhoef, H.A., Witteveen, J., 1980. Water balance in Collembola and its relation to habitat selection; cuticular water loss and water uptake. J. Insect Physiol. 26, 201–208. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(80\)90081-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(80)90081-5).
- Waagner, D., Bayley, M., Holmstrup, M., 2011. Recovery of reproduction after drought in the soil living *Folsomia candida* (Collembola). Soil Biol. Biochem. 43, 690–692. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2010.11.028>.
- Wallace, M.M.H., 1968. The ecology of *Sminthurus viridis* (Collembola): II. Diapause in the aestivating egg. Aust. J. Zool. 16, 871–883. <https://doi.org/10.1071/ZO9680871>.
- Walski, T., Van Damme, E.J.M., Smargiasso, N., Christiaens, O., De Pauw, E., Smaghe, G., 2016. Protein N-glycosylation and N-glycan trimming are required for postembryonic development of the pest beetle *Tribolium castaneum*. Sci. Rep. 6, 35151. <https://doi.org/10.1038/srep35151>.
- Warburg, M.R., 1993. Evolutionary Biology of Land Isopods, Evolutionary Biology of Land Isopods. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-21889-1>.
- Westerberg, R., Månsson, J.-E., Golozoubova, V., Shabalina, I.G., Backlund, E.C., Tvrdik, P., Retterstøl, K., Capecchi, M.R., Jacobsson, A., 2006. ELOVL3 Is an Important Component for Early Onset of Lipid Recruitment in Brown Adipose Tissue. J. Biol. Chem. 281, 4958–4968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511588200>.
- Whyard, S., Singh, A.D., Wong, S., 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 824–832. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.007>.
- Winston, P.W., Bates, D.H., 1960. Saturated Solutions For the Control of Humidity in Biological Research. Ecology 41, 232–237.
- Woods, H.A., Bonneau, R.T., Zrubek, B., 2005. Oxygen and water flux across eggshells of *Manduca sexta*. J. Exp. Biol. 208, 1297–308. <https://doi.org/10.1242/jeb.01525>.
- Wu, X., Zhan, X., Gan, M., Zhang, D., Zhang, M., Zheng, X., Wu, Y., Li, Z., He, A., 2013. Laccase2 is required for sclerotization and pigmentation of *Aedes albopictus* eggshell. Parasitol. Res. 112, 1929–1934. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3349-8>.
- Xavier, L.R., 2018. Investigações sobre a formação da cutícula serosa e papel dos genes DOPA decarboxylase e grainyhead na embriogênese de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Universidade Estadual

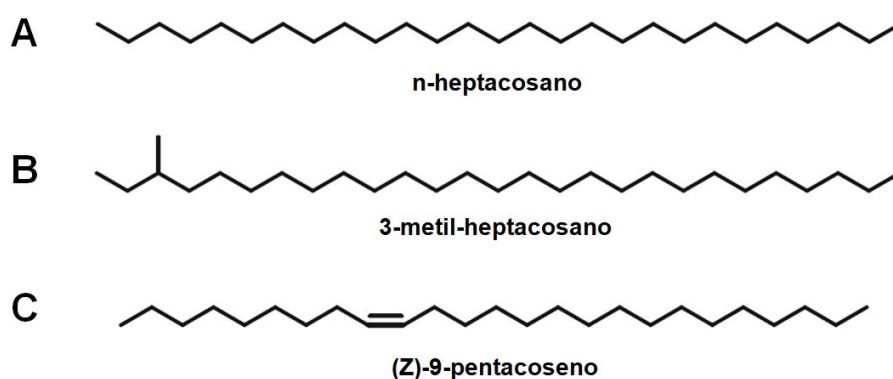
- do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Yeats, T.H., Rose, J.K.C., 2013. The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiol.* 163, 5–20. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222737>.
- Zeh, D.W., Zeh, J.A., Smith, R.L., 1989. Ovipositors, Amnions and Eggshell Architecture in the Diversification of Terrestrial Arthropods. *Q. Rev. Biol.* 64, 147–168. <https://doi.org/10.1086/416238>.
- Zhang, K., Kniazeva, M., Han, M., Li, W., Yu, Z., Yang, Z., Li, Y., Metzker, M.L., Allikmets, R., Zack, D.J., Kakuk, L.E., Lagali, P.S., Wong, P.W., MacDonald, I.M., Sieving, P.A., Figueroa, D.J., Austin, C.P., Gould, R.J., Ayyagari, R., Petrukhin, K., 2001. A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat. Genet.* 27, 89–93. <https://doi.org/10.1038/83817>.
- Zhang, Z.Q., 2011. Animal biodiversity: An introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa* 3148, 7–12.
- Zheng, T., Li, H., Han, N., Wang, S., Hackney Price, J., Wang, M., Zhang, D., 2017. Functional Characterization of Two Elongases of Very Long-Chain Fatty Acid from *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sci. Rep.* 7, 10990. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11134-y>.
- Zuo, W., Li, C., Luan, Y., Zhang, H., Tong, X., Han, M., Gao, R., Hu, H., Song, J., Dai, F., Lu, C., 2018. Genome-wide identification and analysis of elongase of very long chain fatty acid genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genome* 61, 167–176. <https://doi.org/10.1139/gen-2017-0224>.

## APÊNDICE A

O Apêndice A consiste de experimentos de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massa (GC-MS) visando identificar hidrocarbonetos em ovos de *T. castaneum* selvagens e silenciados para o gene *Tc-elov104*. Esses dados foram obtidos junto ao laboratório chefiado pelo Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento, com auxílio do especialista na área, Dr. Sidnei Mateus e da doutoranda M. Sc Amanda Prato da Silva do Programa de Pós-graduação em Entomologia (PPGE) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (FFCL-USP/RP).

### 1. Introdução

Os hidrocarbonetos (HC) são moléculas de lipídeos não-polares, derivadas de ácidos graxos, que nos insetos são encontradas na epicutícula do tegumento (vide Item 1.2.1 da Introdução Geral). Os HC possuem funções de atuar como barreira protetora contra a dessecação, contra a ação de microrganismos e contra a entrada de inseticidas e atuam ainda na comunicação química, como feromônios (Blomquist e Bagnères, 2010; Ginzl e Blomquist, 2016). Em insetos, são reportados centenas de HCs que são divididos em três grupos: n-alcenos, alcenos metilados e HCs insaturados (alcenos) (Figura 1). Há ainda os insaturados metilados, contudo esses são raros (Ginzl e Blomquist, 2016).



**Figura 1: Estruturas representativas das três principais classes de hidrocarbonetos cuticulares de insetos.** A: n-alceno; B: alceno metilado; C: alceno (HC insaturado). Adaptado de Ginzl e Blomquist (2016).

A via de síntese dessas moléculas varia de acordo com o tipo de HC a ser formado. Os 2-metil alcanos são formados a partir do alongamento de cadeias de carbono de valina (no caso de cadeias com número par de carbonos) ou isoleucina (no caso de cadeias com número ímpar de carbonos). Os 3-metil hidrocarbonetos são sintetizados a partir de proprionato. Já a síntese de n-alcanos e alcenos ocorre da seguinte forma: ácidos graxos (AGs) com 16 carbonos são alongados pela via de alongamento que inclui a participação da elongase, formando os AG de cadeia muito longa que, por sua vez, são reduzidos a aldeídos que por fim são descarbonilados formando os n-alcanos (vide Introdução do Capítulo 1). Alcenos são formados com uma etapa enzimática adicional de oxidação, através da ação de uma dessaturase, o que forma uma dupla ligação entre carbonos (Blomquist, 2010; Ginzel e Blomquist, 2016).

Em insetos adultos, os HCs são sintetizados por células originadas da ectoderme, os oenócitos, que estão associados às células epidérmicas ou ao corpo gorduroso e utilizam lipoforinas para transportar os HCs através da hemolinfa (Baki *et al.*, 2014). Devido a sua origem, os oenócitos não se fazem presentes no início do desenvolvimento embrionário. A maior parte dos HCs encontrado nos ovócitos é de origem materna (Fruttero *et al.*, 2017). Contudo, em *Triatoma infestans* já foi comprovada a capacidade dos ovos de sintetizar HC a partir da presença de precursores (Juárez, 1994).

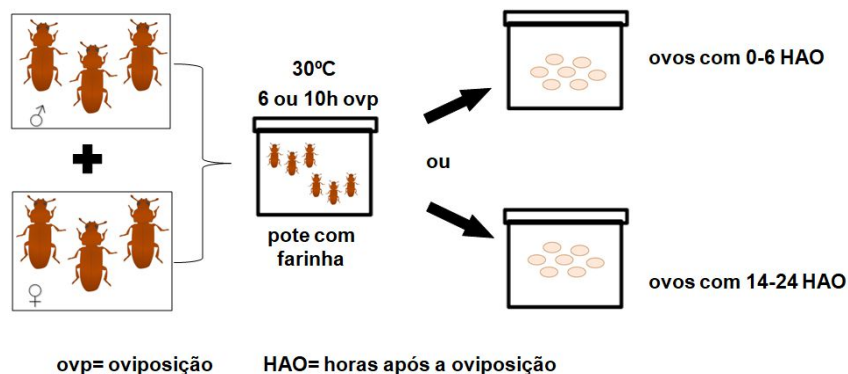
Os AGs de cadeia longa são necessários para a síntese de HCs que, por sua vez, são importantes para a impermeabilização cuticular de insetos adultos (Qiu *et al.*, 2012). Além disso, muito recentemente foi mostrada a relevância de genes *elovl* para a formação de HCs em ninfas e adultos de insetos (Li *et al.*, 2019). Nós avaliamos se o silenciamento do gene *Tc-elovl04* afetaria a formação de HCs nos ovos de *T. castaneum*.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Coletas dos ovos**

As oviposições foram realizadas como descrito na metodologia 4.3.2 do Capítulo 1. Dois grupos de fêmeas foram utilizados: selvagens e silenciadas para *Tc-elovl04*. Dois tempos de oviposição foram empregados. Fêmeas que

ovipuseram por 6 horas em que os ovos foram coletados tendo idade entre 0 e 6 horas. Na segunda situação, as fêmeas ovipuseram por 10 horas, quando foram retiradas e os ovos seguiram se desenvolvendo por mais 14 horas, quando foram processados, com idade entre 14 e 24 horas (Figura 2).



**Figura 2: Esquema gráfico da oviposição de *T. castaneum* e da coleta dos ovos para a extração de hidrocarbonetos.** Grupos de fêmeas virgens (selvagens ou silenciadas para *Tc-elov104*) foram mantidos, junto a machos virgens, em potes plásticos com farinha por seis ou 10 horas a 30 °C. Os ovos oriundos desta oviposição foram processados e submetidos à extração de hidrocarbonetos.

O racional para se trabalhar com grupos de ovos de 0-6 e 14-24 horas de idade está relacionado com a abordagem experimental empregada: a dupla fita de RNA (dsRNA) para *Tc-elov104*, que acarreta o silenciamento gênico via RNAi, foi injetada na mãe. Como visto no Capítulo 1, a dsRNA injetada na mãe leva ao silenciamento de genes expressos no ovo, mesmo aqueles que são expressos apenas em estágios pós-zigóticos. No entanto, o silenciamento para *Tc-elov104* pode também acarretar efeitos na fêmea, o que pode levar a uma alteração na produção de compostos que seriam, por exemplo, produzidos na ovogênese ou na coriongênese, quando as camadas da casca de origem materna estão sendo produzidas (Rezende *et al.*, 2016). Assim, a análise de ovos com 0 - 6 horas de idade responderia se compostos oriundos da mãe foram afetados, enquanto a análise de ovos com 14-24 horas mostraria se compostos oriundos de estágios pós zigóticos foram afetados. Até 6 horas de idade são expressos mRNAs oriundos da mãe (Ribeiro *et al.*, 2017) e entre 14 e 24 horas a cutícula serosa já está formada (vide Figura 26, Capítulo 1).

## 2.2 Extrações dos HCs com hexano

Antes de iniciar os procedimentos, os materiais utilizados para a manipulação das amostras (placas de petri de vidro, pincéis, peneiras de

plástico e funil de vidro) foram lavados com hexano (Vetec, CAS: 110-54-3) para eliminar qualquer possível contaminante.

Originalmente quatro condições seriam analisadas: 1) HCs da superfície de ovos selvagens, 2) HCs da superfície de ovos silenciados para *Tc-elovl4*, 3) HCs do interior de ovos selvagens e 4) HCs do interior de ovos silenciados para *Tc-elovl4*. Foram obtidos amostras de ovos das quatro condições, no entanto, não houve tempo hábil para realizar as análises de GC-MS das condições 3 e 4.

Os ovos, mantidos em farinha de trigo, foram peneirados com peneira de malha 300  $\mu\text{m}$  e pesados. O peso padrão foi definido para 6,6 mg de ovos sujos com farinha. Os ovos foram lavados em água sanitária (Marca Candura, lote 005, cloro ativo 2 a 2,5% p/p) por um minuto e posteriormente lavados em água destilada por dois minutos e 30 segundos. Com o auxílio de um pincel, os ovos foram transferidos para placas de petri de vidro e 5 mL de hexano foram utilizados para extrair os HCs da superfície dos ovos. O tempo de extração foi de um minuto. Após este período, o hexano foi transferido para um frasco de vidro de 1,5 mL limpo com auxílio de um funil e uma peneira. O frasco - contendo os HCs - permaneceu por quatro horas em capela de exaustão para evaporar o hexano. Após este período, o material foi ressuspensão em 20  $\mu\text{L}$  de hexano. O frasco foi homogeneizado em “vortex” por um minuto. Posteriormente, foram aplicados 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra no equipamento para análise.

As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massa CG-MS (SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010) equipado com a coluna capilar de silicone de 25 metros e hélio como gás carreador com fluxo de 1 mL/min. O método utilizado contou com uma rampa de temperatura de 150 até 280 °C a uma taxa de 7 °C por minuto e a temperatura máxima foi mantida por 10 minutos.

### **3. Resultados Preliminares e Discussão**

Conforme mencionado acima no Item 2.2, os resultados preliminares aqui apresentados se referem às condições de HCs extraídos da superfície de ovos selvagens e silenciados.

### ***3.1. Hidrocarbonetos encontrados na superfície de ovos selvagens e silenciados com 0-6 horas de idade***

Os resultados apresentados abaixo foram parcialmente avaliados pela doutoranda M.Sc Amanda Prato da Silva do PPGE, FFCL-USP/RP. Os cromatogramas dos ovos selvagens e silenciados com 0-6 HAO apontam para uma variação na quantidade dos compostos encontrados na superfície dos ovos (Figura 3). Os compostos obtidos para o grupo controle não puderam ser identificados a tempo da conclusão desta tese. A identificação foi realizada apenas para o grupo silenciado (Tabela 1).

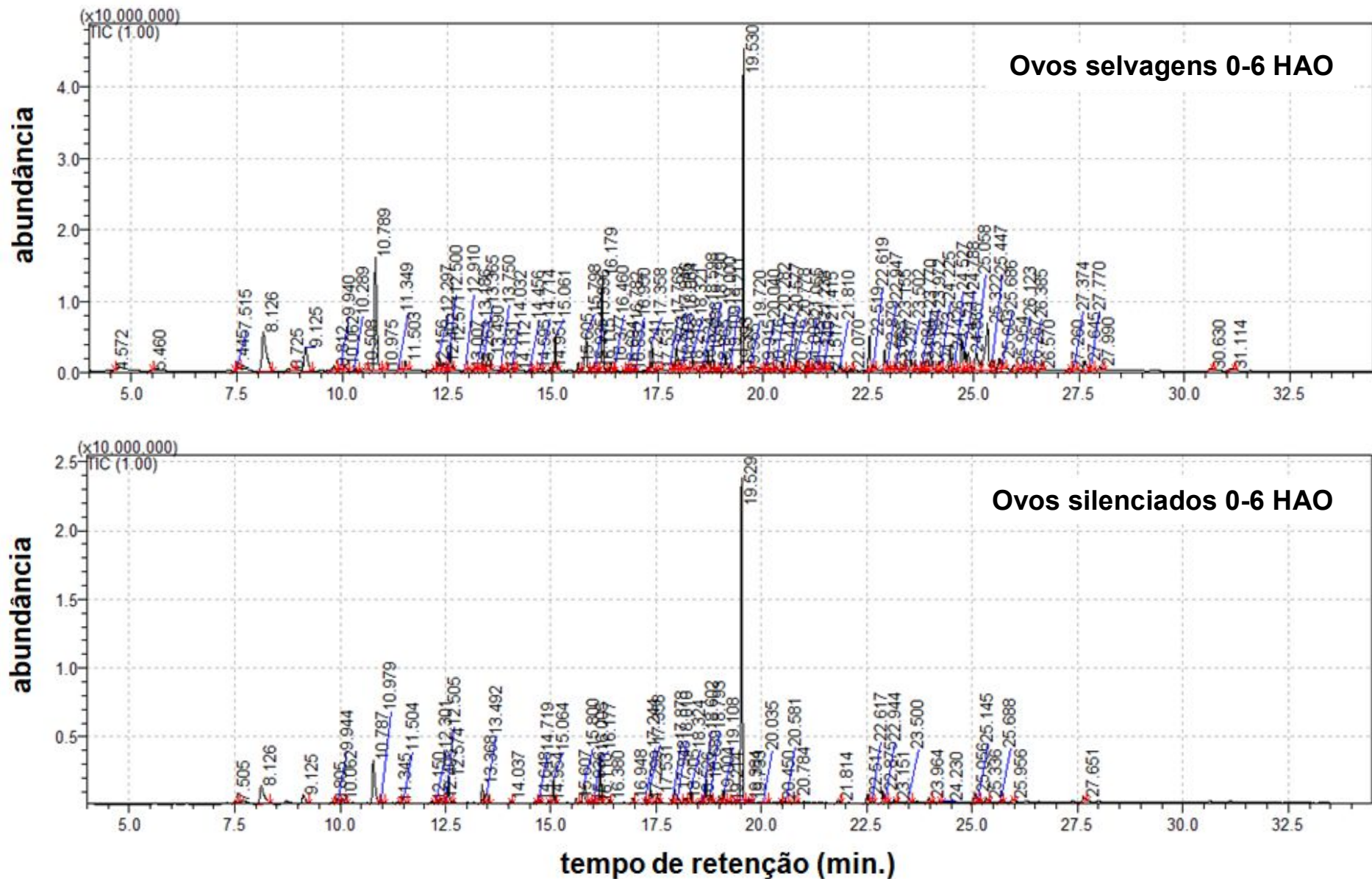


Figura 3: Cromatograma de compostos extraídos da superfície de ovos de *T. castaneum* de 0-6 HAO e analisados por GC-MS. Foram avaliados grupos de ovos selvagem e silenciados para *Tc-elov104*.



Observamos no cromatograma do grupo de ovos controle um elevado pico no tempo de retenção de 19,530 min, que foi identificado como sendo esqualeno. Este pico também se faz presente no grupo de ovos silenciados (pico 45, tempo de retenção 19,529 min.), contudo, observamos uma redução em sua quantidade no grupo silenciado. Artrópodes não são capazes de sintetizar esqualeno (Downer, 1985) apesar de ser frequentemente descrito em artrópodes hematófagos, sendo possivelmente obtido pela dieta (Juárez e Blomquist, 1993; Yoder *et al.*, 1993).

Dentre os compostos identificados no grupo silenciado, encontramos a presença de triacilglicerol (lipídeo de reserva) e colesterol (lipídeo de membrana) o que indica que, o tempo de extração com hexano foi capaz de captar lipídeos internos do ovo. As análises identificaram a presença de ftalato (pico 33, tempo de retenção 16,177 min.) no grupo silenciado. O mesmo pico, em maior quantidade, pode ser observado no grupo controle. O ftalato é um diéstero do ácido ftálico de uso frequente na indústria. É encontrado em tintas, lubrificantes, plásticos e inseticidas (Gao e Wen, 2016; Roslev *et al.*, 2007). Provavelmente, a detecção deste composto nas análises ocorreu devido ao uso de peneiras de plásticos utilizadas na manipulação dos ovos, como também os potes plásticos utilizados para a oviposição dos ovos. Para análises futuras será necessário definir uma nova alternativa para manipulação dos ovos.

**Tabela 1: Compostos identificados em GC-MS da superfície de ovos silenciados para *Tc-elov104* com 0-6 HAO**

Pico	Tempo de retenção	Área	Área%	Peso	Peso%	A/P	Compostos
1	7.515	398677	0.26	122464	0.21	3.26	4,8,12-tetradecatrienal - 5,9,13-trimethyl
2	8.126	9249741	5.94	1347418	2.28	6.86	Hexadecanol
3	8.624	114230	0.07	36923	0.06	3.09	C19
4	8.725	674422	0.43	171919	0.29	3.92	Methyl palmitate
5	9.125	3303576	2.12	626101	1.06	5.28	?
6	9.632	131358	0.08	33006	0.06	3.98	Ethyl palmitate
7	9.811	391221	0.25	119534	0.20	3.27	Hexadecanol acetate
8	9.944	974569	0.63	261226	0.44	3.73	Octadecanal
9	10.005	-3099	-0.00	-3393	-0.01	0.91	C20
10	10.062	969822	0.62	230878	0.39	4.20	Isopropyl palmitate
11	10.787	11616137	7.46	3091756	5.22	3.76	Octadecanol
12	10.850	1393838	0.90	844534	1.43	1.65	Methyl linoleate
13	10.979	564753	0.36	184382	0.31	3.06	Methyl oleate
14	11.238	161291	0.10	54717	0.09	2.95	C21
15	11.352	440082	0.28	140254	0.24	3.14	Methyl stearate
16	11.504	991859	0.64	489034	0.83	2.03	Ethyl hexyl-p-methoxycinnamate
17	12.301	1046732	0.67	362122	0.61	2.89	1-Dodecanol, 2-octyl
18	12.405	925334	0.59	333918	0.56	2.77	Octadecyl acetate
19	12.530	226391	0.15	103473	0.17	2.19	C22
20	12.574	5467098	3.51	1955123	3.30	2.80	Eicosanal
21	13.368	2560876	1.65	1191270	2.01	2.15	Eicosanol
22	13.475	894525	0.57	485458	0.82	1.84	?
23	13.492	1799951	1.16	808899	1.37	2.23	4,8,12,16- Octadecatetraenal, 4,9,13,17-tetramethyl
24	13.753	163508	0.11	69794	0.12	2.34	C23
25	14.037	567959	0.36	251996	0.43	2.25	?

26	14.719	482589	0.31	226148	0.38	2.13	Benzoic acid, tetramethyl ester
27	14.954	462222	0.30	217336	0.37	2.13	C24
28	15.064	4192116	2.69	1816144	3.07	2.31	Docosanal
29	15.607	1051815	0.68	421079	0.71	2.50	?
30	15.800	3084172	1.98	1455336	2.46	2.12	Docosanol
31	15.936	316806	0.20	160063	0.27	1.98	Benzoic acid, pentadecyl ester
32	16.117	66113	0.04	38353	0.06	1.72	C25
33	16.177	7465947	4.80	3322902	5.61	2.25	Ftalato
34	16.948	1062076	0.68	432090	0.73	2.46	3-Me C25
35	17.244	666023	0.43	272042	0.46	2.45	C26
36	17.358	2855148	1.83	1176341	1.99	2.43	CAS 6197-30-4 ?
37	17.948	3159865	2.03	983696	1.66	3.21	?
38	18.324	2109113	1.36	903285	1.53	2.33	C27
39	18.689	3882714	2.49	1629676	2.75	2.38	13-,11- MeC27
40	18.790	850479	0.55	695526	1.18	1.22	7-MeC27
41	19.004	1426664	0.92	495294	0.84	2.88	11-15-; 13-17- DiMeC27
42	19.108	2484154	1.60	882112	1.49	2.82	3-MeC27
43	19.214	202934	0.13	101778	0.17	1.99	5,11- ; 5-13- DiMeC27
44	19.384	303509	0.20	166594	0.28	1.82	C28
45	19.529	53860943	34.64	23563628	39.81	2.29	Squalene
46	19.733	369671	0.24	135774	0.23	2.72	14-, 12-, 10-MeC28
47	20.450	580292	0.37	267095	0.45	2.17	C29
48	20.580	318963	0.20	143860	0.24	2.22	Triglicerol
49	20.784	1313285	0.84	478193	0.81	2.75	15-, 13-, 11-MeC29
50	21.005	192707	0.12	133587	0.23	1.44	Tetradecanoic acid, tetramethyl ester
51	21.010	86119	0.06	83346	0.14	1.03	Dodecanoic acid, hexadecyl ester
52	21.814	610113	0.39	201924	0.34	3.02	?
53	22.070	210952	0.14	90637	0.15	2.33	?

<b>54</b>	22.517	1827928	1.17	647931	1.09	2.82	Colesterol
<b>55</b>	22.617	367631	0.24	149511	0.25	2.46	Triglicerol
<b>56</b>	22.875	2411921	1.55	855792	1.45	2.82	?
<b>57</b>	22.944	850892	0.55	314918	0.53	2.70	?
<b>58</b>	23.151	798834	0.51	277969	0.47	2.87	?
<b>59</b>	23.500	1121400	0.72	428121	0.72	2.62	?
<b>60</b>	23.964	1222236	0.79	293659	0.50	4.16	?
<b>61</b>	25.056	2242288	1.44	725802	1.23	3.09	?
<b>62</b>	25.137	650771	0.42	214824	0.36	3.03	?
<b>63</b>	25.336	949719	0.61	306423	0.52	3.10	Hexadecanoic acid, hexadecyl ester
<b>64</b>	25.688	668757	0.43	218195	0.37	3.06	?
<b>65</b>	25.956	801115	0.51	229603	0.39	3.49	?
<b>66</b>	27.651	1403196	0.90	379089	0.64	3.70	?
<b>67</b>	27.992	578897	0.37	133509	0.23	4.34	?
<b>68</b>	30.636	517965	0.33	112722	0.19	4.60	?
<b>69</b>	31.126	518062	0.33	96198	0.16	5.39	?

### **3.2. Compostos identificados na superfície de ovos selvagem e silenciados com 14-24 de idade**

Assim como os dados obtidos para ovos com 0-6 HAO, os resultados aqui apresentados foram parcialmente analisados. Os cromatogramas dos ovos selvagens e silenciados com 14-24 HAO apontam para uma pequena variação na quantidade dos compostos encontrados (Figura 4). Assim como na superfície de ovos de 0-6 HAO, esqualeno foi observado no grupo de ovos silenciado (pico 47, tempo de retenção 19,529 min.) e também nos do grupo selvagem. Assim como ocorreu com os ovos de 0-6 HAO, detectamos a presença de ftalato dentre os compostos presentes nas amostras analisadas. Dentre os ovos silenciados foi identificada a presença de  $\alpha$ -tocoferol, um tipo de vitamina E. Este composto já foi descrito na cutícula de larvas do Lepidoptera *Spodoptera cosmioides*, contudo sua função na cutícula de insetos é desconhecida (Fronza *et al.*, 2013). Os compostos analisados para o grupo de ovos silenciados encontram-se na Tabela 2.

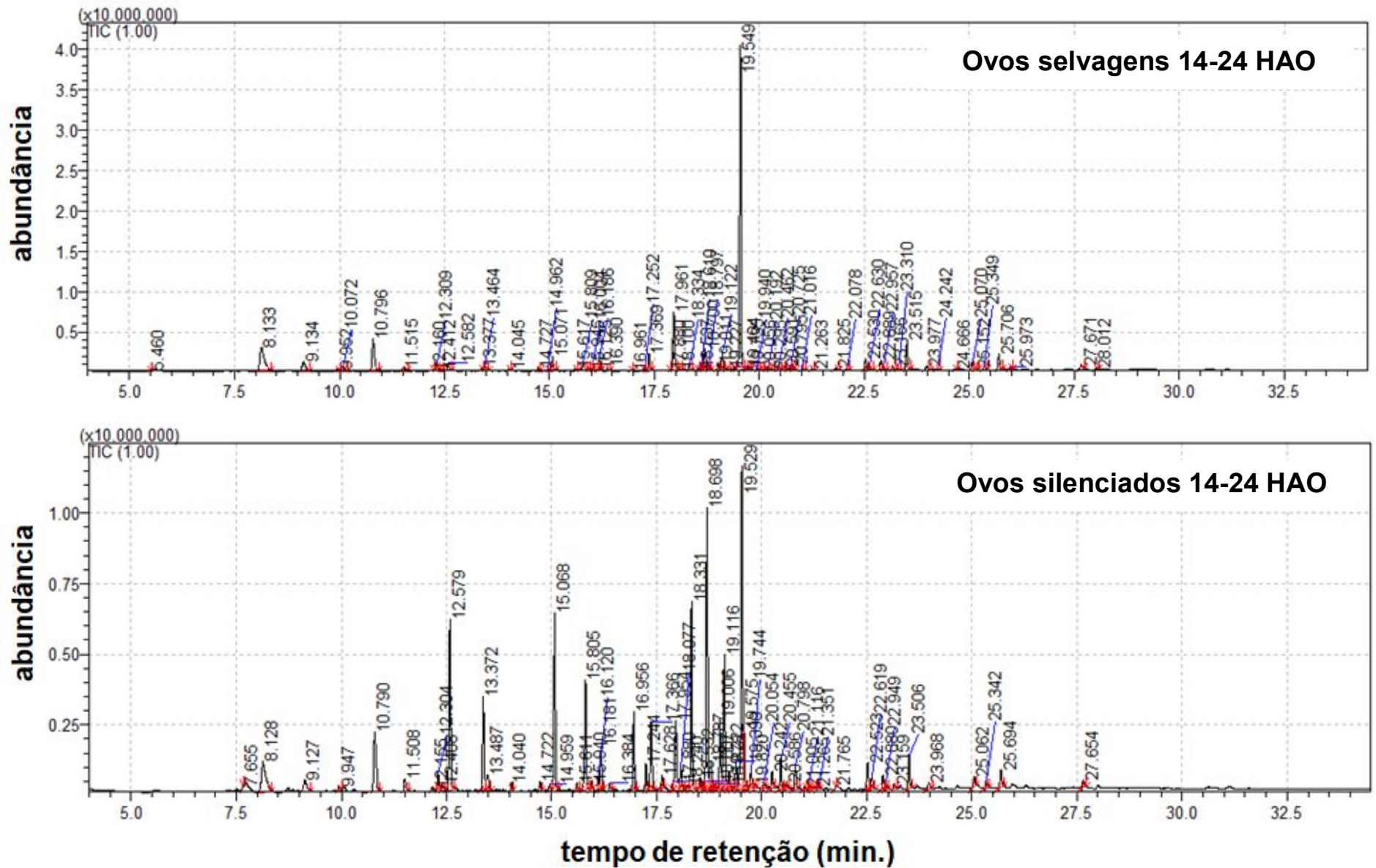


Figura 4: Cromatograma de compostos extraídos da superfície de ovos de *T. castaneum* de 14-24 HAO e analisados por GC-MS. Foram avaliados grupos de ovos selvagem e silenciados para *Tc-elov104*.

**Tabela 2: Compostos identificados em GC-MS de ovos silenciados para *Tc-elov104* com 14-24 HAO**

Picos	Tempo de retenção	Área	Área %	Peso	Peso %	A/P	Compostos
1	7.723	687278	0.28	151337	0.16	4.54	?
2	8.128	8138745	3.33	1106372	1.20	7.36	Hexadecanol
3	8.731	356649	0.15	88047	0.10	4.05	Methyl palmitate
4	9.127	2206739	0.90	397323	0.43	5.55	Octyl ether
5	9.643	94259	0.04	23587	0.03	4.00	Ethyl palmitate
6	9.818	114184	0.05	40600	0.04	2.81	Hexadecanol acetate
7	9.947	504858	0.21	161411	0.18	3.13	Octadecanal
8	10.067	645759	0.26	164369	0.18	3.93	Isopropyl palmitate
9	10.296	330218	0.14	85705	0.09	3.85	Ftalato
10	10.790	8732957	3.57	2123103	2.31	4.11	Octadecanol
11	11.240	122369	0.05	39698	0.04	3.08	C21
12	11.508	1766455	0.72	474382	0.52	3.72	?
13	12.304	1786831	0.73	601017	0.65	2.97	CAS 5333-42-6
14	12.408	660375	0.27	241214	0.26	2.74	Octadecanol acetate
15	12.525	-25106	-0.01	0	0.00	0.00	C22
16	12.579	1703297	6.97	5973802	6.49	2.85	Eicosanal
17	13.372	8804501	3.60	3307463	3.59	2.66	Eicosanol
18	13.465	655643	0.27	322753	0.35	2.03	4,9,13,17-tetramethyl-4,8,12,16-octadecatetraenal
19	13.487	1269588	0.52	538819	0.59	2.36	?
20	13.754	186227	0.08	81335	0.09	2.29	C23
21	13.841	203975	0.08	63814	0.07	3.20	?
22	14.722	870482	0.36	339042	0.37	2.57	Benzoic acid, tetradecyl ester
23	14.959	572296	0.23	254899	0.28	2.25	C24
24	15.068	1448261	5.92	6279031	6.82	2.31	Docosanal

25	15.805	1000383 2	4.09	3918961	4.26	2.55	Docosanol
26	15.940	533939	0.22	264956	0.29	2.02	Benzoic acid, pentadecyl ester
27	16.120	1210837	0.50	570457	0.62	2.12	C25
28	16.181	3502801	1.43	1551089	1.68	2.26	Ftalato
29	16.384	794592	0.33	294463	0.32	2.70	?
30	16.526	230837	0.09	84482	0.09	2.73	13-; 11-MeC25
31	16.789	63614	0.03	32751	0.04	1.94	Octanoic acid, hexadecyl ester
32	16.956	6079099	2.49	2793270	3.03	2.18	3-MeC25
33	17.245	2168111	0.89	968358	1.05	2.24	C26
34	17.366	7012859	2.87	2425680	2.63	2.89	CAS 6197-30-4 ?
35	17.628	1139706	0.47	461391	0.50	2.47	14-; 12-; 10-MeC26
36	17.954	8487896	3.47	2465469	2.68	3.44	Squalane
37	18.077	2615263	1.07	749868	0.81	3.49	Tetracosanol
38	18.240	259369	0.11	112525	0.12	2.30	4,6-; 4,12 diMeC26
39	18.331	1456882 8	5.96	6672906	7.25	2.18	C27
40	18.699	2545963 1	10.42	9979924	10.84	2.55	13-; 11-MeC27
41	18.787	2734170	1.12	970707	1.05	2.82	7-MeC27
42	19.006	7238589	2.96	2528009	2.74	2.86	11,15-; 13,17-DiMeC27
43	19.116	1297172 5	5.31	4758962	5.17	2.73	3-MeC27
44	19.222	1548086	0.63	593534	0.64	2.61	5,11-; 5,13-DiMeC27
45	19.390	2444958	1.00	970943	1.05	2.52	C28
46	19.500	2117974	0.87	2102278	2.28	1.01	3,9-; 3,11-; 3,13-DiMeC27
47	19.529	2810626 3	11.48	1140848 2	12.36	2.46	Squalene
48	19.575	4000182	1.64	2126246	2.31	1.88	Hexacosanal
49	19.744	2008930	0.82	606506	0.66	3.31	14-; 12-; 10-MeC28



50	19.813	365396	0.15	166035	0.18	2.20	3,7,11-TriMeC27
51	20.054	475555	0.19	169540	0.18	2.80	?
52	20.242	952815	0.39	474357	0.52	2.01	Hexacosanol
53	20.280	249522	0.10	160700	0.17	1.55	Cholesteryl propionate
54	20.366	236319	0.10	98581	0.11	2.40	4,12-DiMeC28
55	20.455	2597857	1.06	1112369	1.21	2.34	C29
56	20.586	682625	0.28	300792	0.33	2.27	Triglyceride
57	20.798	2271183	0.93	804750	0.87	2.82	15-; 13-; 11-MeC29
58	20.906	126138	0.05	57726	0.06	2.19	7-MeC29
59	21.011	303364	0.12	117866	0.13	2.57	Tetradecanoic acid, tetradecyl ester
60	21.116	625162	0.26	278382	0.30	2.25	11,15-DiMeC29
61	21.258	359153	0.15	129994	0.14	2.76	3-MeC29
62	21.351	362620	0.15	150015	0.16	2.42	5,13-; 5,11-DiMeC29
63	21.460	-1357	-0.00	394	0.00	- 3.43	C30?
64	21.528	181562	0.07	79959	0.09	2.27	?
65	21.634	60460	0.02	27494	0.03	2.20	?
66	21.765	465554	0.19	184656	0.20	2.52	?
67	21.815	565679	0.23	135459	0.15	4.18	?
68	22.523	2583052	1.06	946596	1.03	2.73	Cholesterol
69	22.619	1405361	0.57	458690	0.50	3.06	?
70	22.880	1363071	0.56	496451	0.54	2.75	?
71	23.159	671465	0.27	220583	0.24	3.04	Hexadecanoic acid, tetradecyl ester ou Tetradecanoic acid hexadecyl ester
72	23.303	505867	0.21	132899	0.14	3.81	Alfa-tocopherol
73	23.507	3134799	1.28	1194242	1.30	2.62	?
74	23.967	948279	0.39	228566	0.25	4.15	?
75	24.235	271454	0.11	101796	0.11	2.67	?
76	25.062	1311904	0.54	431022	0.47	3.04	?

<b>77</b>	25.342	827026	0.34	273365	0.30	3.03	Hexadecanoic acid, hexadecyl ester
<b>78</b>	25.694	1914163	0.78	622220	0.68	3.08	?
<b>79</b>	27.654	1113302	0.46	273282	0.30	4.07	Hexadecenoic acid, eicosyl ester

#### 4. REFERÊNCIAS

- Blomquist, G.J., Bagnères, A.-G., 2010. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons, in: Blomquist, G.J., Bagnères, A.-G. (Orgs.), *Insect Hydrocarbons*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 3–18. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511711909.002>.
- Blomquist, G.J., 2010. Biosynthesis of cuticular hydrocarbons, in: Blomquist, G.J., Bagnères, A.-G. (Orgs.), *Insect Hydrocarbons*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 35–52. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511711909.004>.
- Downer, R.G.H., 1985. Lipid Metabolism, in: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Orgs.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, p. 77–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-030811-1.50009-X>.
- Fronza, E., Miguez, I., Specht, A., De Barros, N.M., Heinzen, H., 2013. Identification of -tocopherol and -tocopheryl acetate from the cuticle of soybean pods armyworm (*Spodoptera cosmioides*). *Nat. Prod. Res.* 27, 1808–1811. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.763125>.
- Fruttero, L.L., Leyria, J., Canavoso, L.E., 2017. Lipids in Insect Oocytes: From the Storage Pathways to Their Multiple Functions, in: Kloc, M. (Org.), *Oocytes: Maternal Information and Functions*. Springer International Publishing, p. 403–434. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_18).
- Gao, D.W., Wen, Z.D., 2016. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* 541, 986–1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>.
- Ginzel, M.D., Blomquist, G.J., 2016. Insect Hydrocarbons: Biochemistry and Chemical Ecology, in: Cohen, E., Moussian, B. (Orgs.), *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*. Springer International Publishing, Cham, p. 221–252. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1_7).
- Juárez, P., 1994. Hydrocarbon biosynthesis in *Triatoma infestans* eggs. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25, 193–206. <https://doi.org/10.1002/arch.940250303>.
- Juárez, P., Blomquist, G.J., 1993. Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *T. mazzotti*. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 106, 667–674. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90147-W](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90147-W).
- Li, D.-T., Chen, X., Wang, X.-Q., Moussian, B., Zhang, C.-X., 2019. The fatty acid elongase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.03.005>.
- Makki, R., Cinnamon, E., Gould, A.P., 2014. The Development and Functions of Oenocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 405–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162056>.
- Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G.J., Feyereisen, R., 2012. An insect-

- specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 14858–14863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208650109>.
- Rezende, G.L., Vargas, H.C.M., Moussian, B., Cohen, E., 2016. Composite Eggshell Matrices: Chorionic Layers and Sub-chorionic Cuticular Envelopes, in: *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*. Springer International Publishing, Cham, p. 325–366. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1_9).
- Ribeiro, L., Tobias-Santos, V., Santos, D., Antunes, F., Feltran, G., de Souza Menezes, J., Aravind, L., Venancio, T.M., Nunes da Fonseca, R., 2017. Evolution and multiple roles of the Pancrustacea specific transcription factor *zelda* in insects. *PLOS Genet.* 13, e1006868. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006868>.
- Roslev, P., Vorkamp, K., Aarup, J., Frederiksen, K., Nielsen, P.H., 2007. Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant. *Water Res.* 41, 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.049>.
- Yoder, J.A., Pollack, R.J., Spielman, A., Sonenshine, D.E., Johnstons, D.E., 1993. Secretion of squalene by ticks. *J. Insect Physiol.* 39, 291–296. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90059-Z).

## ANEXO I

Rezende, G.L., **Vargas, H.C.M.**, Moussian, B., Cohen, E., 2016. Composite Eggshell Matrices: Chorionic Layers and Sub-chorionic Cuticular Envelopes, em: Extracellular Composite Matrices in Arthropods. Springer International Publishing, Cham, pp. 325–366. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1_9).

## Chapter 9

# Composite Eggshell Matrices: Chorionic Layers and Sub-chorionic Cuticular Envelopes

Gustavo L. Rezende, Helena Carolina Martins Vargas, Bernard Moussian, and Ephraim Cohen

**Abstract** Many arthropods and the majority of insects lay their eggs without parental care. These immobile stages of life must rely on the various eggshell layers deposited upon the developing embryo to survive biotic and abiotic stresses such as desiccation, flooding, predators and pathogens. At the same time, these protective layers must allow sperm entry and gas exchanges. During insect oogenesis most of these layers are deposited by the follicle cells: vitelline membrane, wax layer, innermost chorionic layer, endochorion and exochorion. Follicle cells will also produce some regions with chorionic complexities such as micropyles, aeropyles and the operculum. After fertilization and egg deposition, the developing egg of insects and other arthropods produces a blastodermal or serosal cuticle, which is located below the vitelline membrane and serves as an additional protective extracellular structure. Through a literature survey comprising more than 40 species this chapter is dedicated to the description of the formation, structure and physiology of these multilayered and multiregional composite structures as well as the cellular and molecular mechanisms underlying it.

---

G.L. Rezende (✉) • H.C.M. Vargas  
LQFPP, CBB, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil  
e-mail: [guslrezende@gmail.com](mailto:guslrezende@gmail.com); [helenacvargas@gmail.com](mailto:helenacvargas@gmail.com)

B. Moussian  
Genetik der Tiere, Eberhard-Karls Universität Tübingen,  
Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen, Germany  
e-mail: [bernard.moussian@unice.fr](mailto:bernard.moussian@unice.fr)

E. Cohen  
Department of Entomology, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and  
Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76 100, Israel  
e-mail: [ephraim.cohen@mail.huji.ac.il](mailto:ephraim.cohen@mail.huji.ac.il)

© Springer International Publishing Switzerland 2016  
E. Cohen, B. Moussian (eds.), *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*,  
DOI 10.1007/978-3-319-40740-1\_9

325

## 9.1 Introduction

Arthropod eggs are laid in extremely wide niches of habitats and microhabitats, and are exposed to various physical and biological challenges. Development of the eggshell is an elaborate and essential physiological adaptation in the evolutionary transition of insects and other arthropods from marine to terrestrial environments. The eggshell is the only protection for those species that lack parental care. Further evolution of species-specific eggshell composition, organization and morphology was likely been driven by the different ecological niches and ovipositional substrates (Zeh et al. 1989). The eggshell is a boundary between the external environment and the developing embryo, and as such, provides protection against desiccation or flooding, predation and invasion of pathogenic microorganisms as well as providing resistance to mechanical stressors or temperature fluctuations. At the same time it participates in embryo patterning and provides access to penetrating sperms, regulates gas exchange of oxygen supply and discharge of carbon dioxide, and allows hatching (Margaritis 1985a). During embryogenesis a cuticular egg envelope is produced in many species. These cuticles will supplement or, in some cases, replace the protection granted by the maternal eggshell layers.

The first part of this chapter deals with maternal eggshell layers in insects while the second part deals with the cuticular egg envelopes (blastodermal or serosal cuticles) that are produced post-zygotically in arthropods. In both parts how these layers are produced, their morphology, the genes and proteins associated with their formation and their physiological role are discussed.

## 9.2 Maternal Eggshell Layers

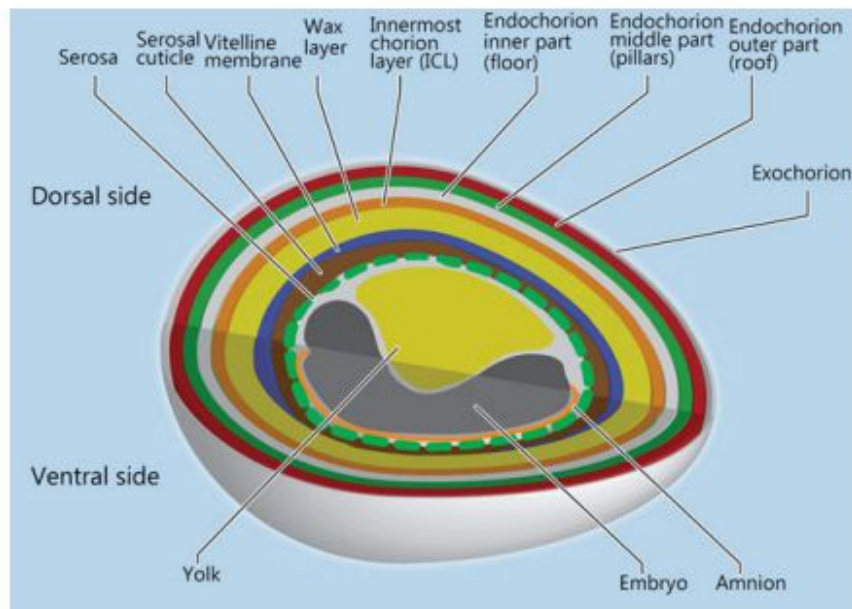
### 9.2.1 Eggshell Structure

Eggshell of oviparous insects is largely a highly organized proteinaceous multilayered multiregional composite structure. Due to its massively organized structural complexity, as well as because of the distinctive spatial and temporal programs, eggshell formation (mainly in the fruit fly *Drosophila melanogaster*) has been used as a model system in developmental biology for the assemblage of complex extracellular matrices (Margaritis et al. 1980; Margaritis 1985a, 1986; Trougakos and Margaritis 2002; Waring 2000; Papantonis et al. 2015). It has been suggested that adaptation to diversified ecological niches drives the evolutionary patterns of insect eggshell layers (Jagadeeshan and Singh 1997). Basically, the eggshell consists of a vitelline membrane close to the oocyte and the chorionic layers of the endochorion and a sculptured outer surface layer, the exochorion. The general morphology and anatomy of such layers has been conserved as described in a rare fossil eggshell about 145 MYA (Fisher and Watson 2015).

Model insects for the fundamental and comprehensive studies on the morphological, histochemical, physiological, biochemical, molecular and genetic aspects of eggshell layers and choriogenesis have largely been restricted to dipteran species like *D. melanogaster*, the olive fly *Dacus oleae*, the cherry fly, *Rhagoletis cerasi*, and the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, or to lepidopteran organisms such as the silkworm *Bombyx mori*, the polyphemus moth *Antheraea polyphemus*, or the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Diagnostic research tools employed in these studies include scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM), laser scanning microscopy (LSM) and freeze-fracturing that provided 3-dimensional images of eggshell surface, internal radial layers and regional structures (Margaritis et al. 1980; Mouzaki and Margaritis 1991a, b; Mouzaki et al. 1991; Orfanidou et al. 1992). Morphogenesis and assembly studies were carried out by immunogold electron microscopy and immunoblot analyses, by pulse-chase autoradiography to follow protein intercalation events and by use of selected mutants defective in eggshell assembly. More recently, proteomic, transcriptome and gene silencing techniques are expanding the findings obtained in the field.

### 9.2.1.1 Radial Organization of Eggshell Layers

The apposition of the composite egg layers is depicted in the schematic presentation in Fig. 9.1. The number of layers is based on a variety of publications mainly describing eggshell morphology and ultrastructure of dipterans (*D. melanogaster*,



**Fig. 9.1** A schematic presentation of the radial complexity of a holometabolous insect egg layers. Size of layers is out of scale. Anterior is to the left. The amnion is produced from the margin of the embryo and it covers only the ventral side of the developing embryo. Embryo position related to the yolk varies in hemimetabolous insects



*A. aegypti*, *Anopheles gambiae*), lepidopterans (*B. mori*, *A. polyphemus*) or of a variety of odonate and coleopteran species. Insect species though may lack certain layers like for instance the wax layer described in higher dipterans that is absent in some lepidopteran and mosquitoes (Monnerat et al. 1999).

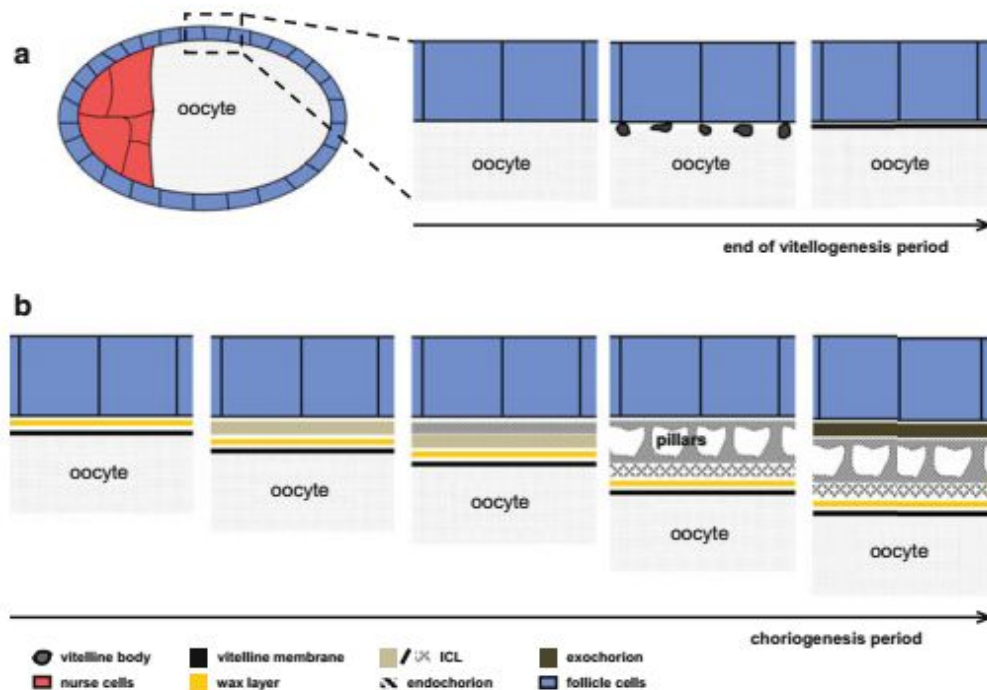
Eggshell vitelline membrane and chorionic layers (wax layer, innermost chorionic layer, endochorion and exochorion) are the secretory products of the ovarian follicular epithelial cells that produce these layers at the last stages of oogenesis (Sect. 9.2.2). Subpopulations of follicle cells are accountable for secretion and assembly of the various radial layers of the chorion as well as for its specialized regional constructs (Sect. 9.2.5). Two unicellular membranes cover the developing embryo: the amnion that covers the embryo ventrally and the serosa that covers the amnion, the entire embryo and the yolk. Both membranes are composed of extraembryonic cells produced at early embryogenesis (Panfilio 2008). The serosa secretes the serosal cuticle, the last eggshell matrix that will be produced and localized beneath the vitelline membrane (Sect. 9.3).

## 9.2.2 Dynamics of Eggshell Formation During Oogenesis

The insect eggshell is a composite matrix synthesized at late oogenesis by the follicular cells that surround the oocyte. This intricate structure is composed of different layers (Margaritis 1985a; Chapman 2013), and its complexity is linked to a rich protein composition and also to an elaborate genetic process that coordinates their synthesis and deposition (Kafatos 1975; Chapman 2013). The process of vitelline membrane and other eggshell layers are well described during *D. melanogaster* oogenesis and will be used to illustrate this process (Hinton 1981; Margaritis 1985a) along with punctual comparisons with other species.

### 9.2.2.1 Eggshell Formation in *Drosophila melanogaster*

The oogenesis of *D. melanogaster* is divided in 14 consecutive stages. The vitelline membrane (VM) is the first eggshell layer to be synthesized at the end of the vitellogenesis period. While genes of vitelline membrane proteins begin to be transcribed between stages 8–10 of oogenesis (Margaritis 1985a; Pascucci et al. 1996), the first signs of its formation arise at stage 9A as small secreted vesicle proteins, the vitelline bodies (Fig. 9.2a) (Klowden 2007; Chapman 2013). Vitelline bodies are also described for *A. aegypti* and the German cockroach *Blattella germanica* (Mathew and Rai 1975; Belles et al. 1993). At stage 10B of *D. melanogaster* the vitelline bodies fuse and form a continuous and functional vitelline membrane (Fig. 9.2a) (Margaritis 1985a). In other insects, VM is secreted directly as a continuous layer as is the case of *B. mori*, *A. polyphemus* and others lepidopterans (Margaritis 1985a). In some species, the oocyte contributes to the synthesis of this structure (Chapman 2013).



**Fig. 9.2** Scheme of eggshell synthesis in the fruit fly *D. melanogaster*. (a) End of the vitellogenesis period, associated with vitelline membrane formation. Initially, the vitelline membrane is secreted as vitelline bodies at stage 9A and becomes a continuous layer at stage 10B. (b) Choriogenesis period occurs between stages 11 and 14, when all other eggshell layers are produced in the following order: wax layer, innermost chorionic layer (ICL), endochorion and exochorion. During choriogenesis, the innermost chorionic layer crystallizes and pillars are formed within the endochorion. The oocyte is the topological reference: the innermost and outermost layers are the vitelline membrane and the exochorion, respectively

In *D. melanogaster* choriogenesis is initiated at the end of oogenesis stage 11A with the formation of the wax layer, located above the VM (Fig. 9.2b). After this step, the formation of both innermost chorionic layer (ICL) and endochorion commences at stage 11B. Between stages 12C to 14A, the formation of pillars occurs within the endochorion. At these stages ICL crystallization takes place and the endochorion is fully formed. The formation of the last, outermost eggshell layer, the exochorion occurs at stage 14A (Fig. 9.2b) (Margaritis 1986). In *B. mori* and other lepidopterans, the choriogenesis is initiated by formation of the trabecular layer (endochorion) (Hinton 1981; Margaritis 1985a).

### 9.2.2.2 Proteins Necessary for the Coordinated Secretion of Eggshell Material

In the fruit fly, the polarity of the follicular epithelium cells depends on the function of canonical polarity determinants like Crumbs (Crb) and Stardust (Sdt) (Fletcher et al. 2012; Sherrard and Fehon 2015). The apical plasma membrane of follicle cells forms a dense array of microvilli that involve the function of Cad99C and Myosin

VIIA (Myo7A) (Schlichting et al. 2006; Glowinski et al. 2014). The microvilli are key structures in the assembly of the vitelline membrane. Emanating from the follicle cells and the oocyte they segregate precursor vitelline bodies. These proteins aggregate, fuse together when the microvilli are retracted suggesting that microvilli play an active role in vitelline membrane construction. In follicle cells lacking Cad99C the function of the precursor vitelline bodies are malformed, and the vitelline membrane is aberrant. The mature vitelline membrane has been postulated to serve as a substrate for chorion assembly (Pascucci et al. 1996).

### 9.2.3 *Inner Eggshell Barriers to Water Permeability and Gas Exchange*

The three layers closest to the oocyte, the VM, wax layer and the ICL are believed to serve as waterproofing barriers and provide resistance to ambient air influx. At the same time, they function also by regulating rates of air influx and carbon dioxide efflux (Margaritis et al. 1983, 1991; Woods et al. 2005).

#### 9.2.3.1 *Vitelline Membrane (VM)*

VM is a homogenous cross-linked robust and flexible layer that varies in thickness among insect species and at different parts of a specific egg. This first eggshell layer in *D. melanogaster* is synthesized by the follicle cells but eventually, it was shown that also the germline contributes components to the VM biogenesis (Ventura et al. 2010). Still, the intricate biochemical and biophysical events taking place in the biogenesis of VM are ill-understood. The discontinuous layer of vitelline bodies is separated by scaffolding microvilli extended from both the oocyte and the follicular cells (D'Alterio et al. 2005; Schlichting et al. 2006). Eventually, the microvilli degenerate or retract thus creating a uniformly continuous layer that thins in later stages of oogenesis. In *D. melanogaster* for example, the identified four major VM proteins, undergo modifications that involve specific proteolytic processes and intermolecular disulfide bridges during oogenesis (Sect. 9.2.6.1). Later, at post-ovulation, the layer undergoes protein stabilization by di- and tri-tyrosine crosslinking (Sect. 9.2.8) (Trogakos and Margaritis 1998a; Heifetz et al. 2001)

The *D. melanogaster* and *A. aegypti* VMs serve as a reservoir for pro-proteins which later, by post-translational modification are processed to smaller components that move into other chorionic layers (Pascucci et al. 1996; Mauzy-Melitz and Waring 2003; Marinotti et al. 2014). The waterproof role of the VM may be indicated by presence of *n*-alkanes and methyl-branched alkanes at the surface of dechorionated eggs of several dipteran species (Nelson and Leopold 2003).

Aside from the role of an eggshell barrier, the VM participates *inter alia* as a spatial determinant signal for both dorso-ventral and terminal pattern formation pathways of the enclosed embryo (Zhang et al. 2009; Stein and Stevens 2014).

### 9.2.3.2 Wax Layer

The wax layer, which is formed by secretion of lipid vesicles by the follicle cells that accumulate on the VM surface, is sandwiched between the VM and the ICL. This hydrophobic layer in *D. melanogaster*, which is initially created by 3–4 overlapping plaques, are later compressed and thinned between the VM that increases in volume due to water uptake and by the rigid non-expandable ICL (Papassideri and Margaritis 1986; Papassideri et al. 1991; 1993). The eggshell wax is apparently similar to cuticular wax, but there are no recent studies identifying its chemical composition. However, genes related with lipid metabolism were recently identified in follicle cells during eggshell formation (Tootle et al. 2011). The hydrocarbons extracted from dechorionated eggs of flies (Nelson and Leopold 2003) might be components of both VM and wax layers. As the wax layer is structurally conserved in drosophilids, it most likely implies its important waterproof function in this taxonomic group (Papassideri et al. 1991). It should be mentioned that some insect species like the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Marchiondo et al. 1999) or the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Ma et al. 2002) lack a wax layer.

### 9.2.3.3 Innermost Chorion Layer (ICL)

ICL (first reported by Margaritis et al. 1979 and Hamodrakas et al. 1982) which is a bridge between the VM plus wax layers and the adjacent endochorionic layer (sometimes called floor) is composed of proteinaceous components synthesized by the follicle cells prior to the other chorionic proteins. Initially, the electron-dense ICL is closely attached to the apposed endochorion. But later, at the end of choriogenesis, detachment occurs as the ICL gradually assumes a unique multilayered structure characterized as a three-dimensional crystal configuration (Fig. 9.2b) (Papassideri and Margaritis 1996). Thus, the final step of protein self-assembly that forms the crystal lattices takes place between two existing eggshell layers (Akey et al. 1987). The ICL is composed of up to four discrete sublayers in several drosophilids with a basic structural unit of crystals that consist of octamers made up of four heterodimers. Parallel to crystallization, stabilization of ICL crystallized structure by intermolecular crosslinking occurs via disulfide bridges and di- and tri-tyrosine bonds (Sect. 9.2.8). Eggshell peroxidase was cytochemically identified as a structural component in ICL of *Drosophila virilis* (Trogakos and Margaritis 1998a).

In addition of functioning as a barrier to water permeability, the ICL facilitates hatching of larvae that get free by shedding the inner eggshell layers.

## 9.2.4 Outer Chorionic Barriers

### 9.2.4.1 Endochorion

The endochorion (Figs. 9.1 and 9.2b) is largely a tripartite structure that consists of a thin inner part (floor), an intermediate region of vertical pillars and pillar cavities, and a solid outer part (roof). The cavities facilitate gas exchange and the roof displays ridges that are the borders of the follicular cell imprints (Waring 2000). The temporal formation of the endochorion involves major early proteins that are detected in all endochorion sublayers. They create the final morphology of the endochorion and provide the scaffold for middle and late proteins that diffuse and intercalate to associate extracellularly with the existing early proteins and shape the final functional endochorionic configuration of *D. virilis* (Trougakos and Margaritis 1998b). Migration and intercalating processes were demonstrated with VM32E protein, which is initially uniformly distributed in *D. melanogaster* VM, and is partially released and trafficked into the endochorionic layer (Andrenacci et al. 2001). It was suggested that a derivative of a proprotein (fc177) cleaved within the VM in *D. melanogaster* prevents the coalescence of the endochorionic tripartite substructures (Mauzy-Melitz and Waring 2003).

Three major endochorionic proteins undergo disulfide bond crosslinking prior to oviposition in *A. aegypti*. Further crosslinking after oviposition occurs via di- and tri-tyrosine bonds mediated by chorion peroxidase activity that involves hydrogen peroxide in addition to quinone crosslinking reaction mediated by phenoloxidase (Sect. 9.2.8) (Li and Li 2006). Peroxidase, which was immunolocalized in ICL and endochorion of *D. melanogaster* and *D. virilis*, is a chorionic component with enzymatic activity (Keramaris et al. 1991; Trougakos and Margaritis 1998a; Konstandi et al. 2005).

### 9.2.4.2 Exochorion

The last secreted layer is the exochorion featuring a sculptured outer surface of the eggshell. It is composed of two lamellar layers in mosquitos (Monnerat et al. 1999) and flies (Mouzaki and Margaritis 1991a, b; Zarani and Margaritis 1994). The architectural patterns of egg chorions that include its specialized regions, depend on imprints of the follicular cells. The sculptured patterns portray reticulated polygonal network design, ridges, protruding tubercles, domes or threads of various shapes and sizes. However, eggs of several stored products coleopterans (Gautam et al. 2015) lack distinct chorionic patterns and are devoid of regional complexities like micropyles and aeropyles. As the sculptured morphological patterns are species-specific they have served for ootaxonomical purpose and may indicate evolutionary adaptation related to oviposition sites (Fausto et al. 1992; Mazzini et al. 1992; Guglielmino et al. 1997; Kumar et al. 2007).

In mosquitoes exochorion sculpture may vary within a single species at different seasons or according to abiotic influences (Clements 1992). Moreover, some species possess an exquisite sculpturing, such as the exochorion of *Anopheles shannoni*, striking in its singularity and complexity, when compared to the exochorion of others mosquitoes (Lounibos et al. 1997; Clements 1992). Exochorion formation is governed by the genetic processes that occur within the follicle cells, such as the dorsal-ventral patterning system (Chasan and Anderson 1993). In this regard, it would be interesting to analyze the genetic process that induces the exochorionic sculpturing differences observed within and between species.

### 9.2.5 Regional Chorionic Complexities

The eggshell chorion is comprised of stripes or flat regions as well as specialized areas like micropyles and micropylar apparatus that facilitates penetration of sperms; aeropyles and respiratory appendages that mediate gas exchange and operculum that enables larval hatching. Distinct subpopulations of cells of the follicular epithelium are responsible for the temporal and spatial creation of these particular regional areas (Waring 2000).

#### 9.2.5.1 Micropyles and Micropylar Apparatuses

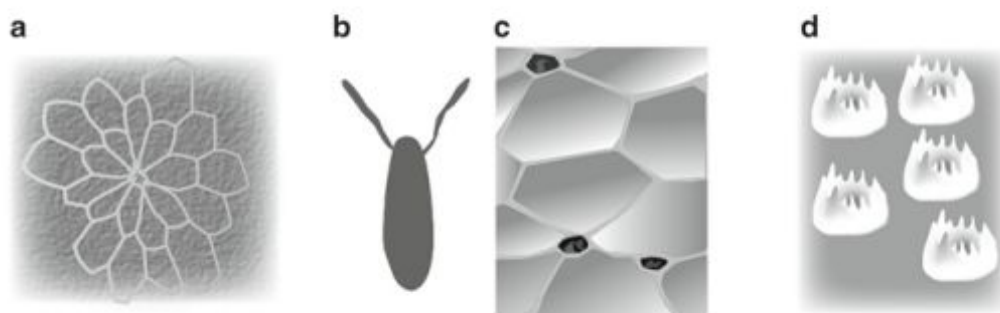
The micropyle is an aperture surrounded by a distinct architectural area that facilitates access of sperms into the oocyte via the micropylar canal that terminate at the VM (as described in the cherry fly *Rhagoletis cerasi* by Zarani and Margaritis 1991). The micropyle appears as a protrusion or a depression in eggshells of Diptera and Lepidoptera, respectively. In lepidopteran species the micropylar pore is surrounded by a rosette of follicle cell imprints (Kumar and Kamble 2008) (Fig. 9.3a). The micropylar canal, which passes through the eggshell, is formed of microvillar extensions of the follicular cells that eventually degenerate (Mouzaki et al. 1991). Morphological patterns of such areas depend on the imprints of the previously overlying follicle cells (Kumar and Kamble 2008; Kumar et al. 2007). The micropyle is located at the anterior pole in dipteran, lepidopteran and neuropterid species (Mouzaki and Margaritis 1991a; Andrew and Tembhare 1992; Kubrakiewicz et al. 2005), or in the mid-ventral region in the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus* (Sarashina et al. 2005), whereas the location of the micropylar appendage in the almond seed wasp *Eurytoma amygdali* or in the beetle *Adalia bipunctata* is at the posterior end (Zarani and Margaritis 1994). It should be noted that although micropyles are functionally entities, many stored products insects (Kučerová and Stejskal 2008; Osawa and Yoshinaga 2009) as well as certain scale insect eggs (Vogelgesang and Szklarzewicz 2001) lack such structures. In such cases there is still an intriguing question regarding penetrations of sperms to fertilize the ovum. Perceptively, viable

eggs like in the subsocial burrower bug, *Adomerus triguttulus*, or the stingless bee *Tetragonisca angustula* have micropyles, whereas their trophic eggs are by and large devoid of such structures (Kudo et al. 2006).

### 9.2.5.2 Aeropyles and Appendages – Respiratory Mechanism

Aeropyles are microscopic apertures (Fig. 9.3c) that either scatter all over the entire chorionic surface or are confined to specific areas on the egg. They can be positioned on protrusions (or crowns, Fig. 9.3d) over entire egg surfaces or arranged in distinct bands or rings (Hatzopoulos and Regier 1987; Regier et al. 2005). Aeropyles are connected via chorion traversing canals to the interior of the egg either directly or to gas-filled meshwork in the inner chorionic layers. Such a meshwork or the trabecular layer was described in *C. felis* (Marchiondo et al. 1999). Functionally, they facilitate air passage and gas exchange for respiration of the metabolically active embryos. The number and surface arrangement of aeropyles varies across insect species. Moreover, they can undergo change in size as was reported for maturing eggs of the Ailanthus silkmoth *Samia ricini* (Renthleil et al. 2010). Aeropyles in lepidopteran species, for example, range in number from a few up to 400 per egg. (Kumar and Kamble 2008). Aeropyles were not detected in eggs of the scale insect *Orthezia urticae* (Vogelgesang and Szklarzewicz 2001), in many aquatic insects or in eggs of certain stored products coleopterans like the stored grain borer *Rhyzopertha dominica* or the red flour beetle *Tribolium castaneum*, where it was suggested that their relatively permeable chorions facilitate gas exchange (Kučerová and Stejskal 2008; Gautam et al. 2015). Diversity of eggshell chorionic structures and characteristics could explain differential tolerance of stored products insects to fumigants (Gautam et al. 2015).

Some eggs of insect species living in aquatic environments develop a structural modification described as a plastron network that traps air film and serve as physical gills that establish an extensive air-water interface when submerged under water (Hinton 1968; Goforth and Smith 2011). A wide and extended plastron was



**Fig. 9.3** Regional structures of insect eggshell. (a) A micropyle surrounded by a rosette pattern of polygonal imprints of follicle cells (*Manduca sexta*). (b) Dorsal respiratory appendages (*Drosophila melanogaster*). (c) Aeropylar apertures (*Abedus herberti*). (d) Aeropylar crown (*Antheraea polyphemus*). Schemes are not in scale

described in eggshells of non-aquatic insect species, like in the blowflies *Chrysomya nigripes* and *Lucilia cuprina* (Sukontason et al. 2004, 2007). Although plastron-like configuration was described, their function has not been unequivocally demonstrated. A different structure is the water-impermeable hydrophobic respiratory horns (Fig. 9.3b) at the anterior end of *D. melanogaster* eggs that obtains oxygen from ambient water. The three-dimensional morphogenesis of *D. melanogaster* respiratory projecting tubes was described by Osterfield et al (2013). It is noteworthy, that compared to *D. melanogaster*, the respiratory appendages of the Hawaiian *Drosophila grimshawi* are four, much longer with a wider surface area that functions as plastron for underwater respiration (Margaritis et al. 1983).

### 9.2.5.3 Operculum

In many species the operculum is a sculptured chorionic region at the anterior pole of the egg that is encircled by hatching lines built into the eggshell to ease larval hatching. Areas of the operculum may harbor aeropyles (Burkhart et al. 1999) and micropyles (Zawadzka et al. 1997; Ma et al. 2002). It was shown that follicular subpopulation of anteriorly migrating cells in *D. melanogaster* form the operculum (Kleve et al. 2006) and the hatching line called collar (Margaritis 1985a). However, hatching lines were not observed in lepidopterans like *S. ricini* as the larva chews its way out of the chorionic egg layers (Renthlei et al. 2010).

### 9.2.6 Genes and Proteins Required for Eggshell Formation

Compared to other protective extracellular matrices such as the cuticle (Chap. 3), the molecular and cellular processes of eggshell protein synthesis and assembly are well studied, including regulation by hormones, gene amplification and *cis* and *trans*-regulatory elements (Turner and Mahowald 1976; Margaritis et al. 1980; Regier and Kafatos 1985; Swevers et al. 2005; Papantonis et al. 2015; Chen et al. 2015a). We therefore rather aim at drawing a general scheme of vitelline membrane and chorion formation rather than a detailed survey of the literature. An arsenal of eggshell genes and proteins have been isolated or described in recent years using modern large-scale proteomic and genomic techniques (e.g. Chen et al. 2015a). These findings complement earlier reports on eggshell genes and proteins.

Description of eggshell proteins, genes and the regulation of their expression are well known largely for *D. melanogaster* and *B. mori* and, to some extent, mosquito vectors of parasites. All of these insects are holometabolous species with polytrophic meroistic ovaries. Recently, the genetic process of eggshell production has been studied in *B. germanica*, a hemimetabolous insect with panoistic ovaries (Chapman 1998; Irls et al. 2009a). Further comparison among these species will shed light on relevant information related to the evolution of the maternal matrices that surround developing insect embryos.



### 9.2.6.1 *Drosophila melanogaster*

In the fruit fly the central proteins of the VM are sV17, sV23, VM32E and VM34C. Many vitelline membrane proteins (VMPs) are rich in proline and alanine and contain a highly conserved hydrophobic domain of 38 residues, the so-called VM domain (Scherer et al. 1988; Wu et al. 2010). A similar domain with conserved amino acids is present in the mosquito *A. aegypti* VMPs (Sect. 9.2.6.3). Another conserved motif of 10 amino acids is present in *D. melanogaster* VM32E and VM34C. VM proteins are embedded in protein networks by different types of cross-linking including disulfide bounds and inter-peptide di-tyrosines. In *D. melanogaster* along with *A. aegypti*, many VM proteins have three precisely spaced cysteines, suggesting disulfide bridge formation (Wu et al. 2010). VM32E contains seven tyrosine residues that may form di-tyrosine crosslinking structures catalyzed by extracellular peroxidases and, apart from being an integral constituent of the VM, are important for the formation of other eggshell layers (Andrenacci et al. 2001).

A mutant allele of sV23 in *D. melanogaster* was analyzed in detail (Savant and Waring 1989; Wu et al. 2010). The exchange of an evolutionary conserved cysteine in the VM domain to serine leads to a collapse of the eggshell and unfertilized eggs. Besides this motif, the hydrophobic N-terminal prodomain of sV23 is also essential for eggshell construction and it is proposed to be crucial for the alignment of matrix proteins during vitelline membrane maturation (Manogaran and Waring 2004).

Three other VMPs, Closca (Clos), Nasrat (fs(1)N) and Polehole (fs(1)ph), which may be grouped as a separate class of integral VMPs were reported to be essential for VM formation (Ventura et al. 2010). Fs(1)N and Fs(1)ph have been shown to be needed for non-disulfide crosslinking of the vitelline protein sVM23 (Cernilogar et al. 2001; Jiménez et al. 2002). Another integral component of the VM is Torsolike that is needed for terminal pattern formation in *D. melanogaster* (Stevens et al. 2003). The VM of eggs derived from homozygous mutant for either of these genes is fragile and brittle. Taken together, these data underline that some components of the VM besides being incorporated in the inert barrier, also serve as a signaling factors regulating early embryo development.

The function of the VM constituent Palisade was also studied in detail (Elalayli et al. 2008). Palisade was initially found in the mass spectrometry screen for eggshell matrix proteins reported by Fakhouri et al. (2006) (see below). Down regulation of Palisade function by RNA interference (RNAi) causes mislocalisation of VMPs such as sV17 and its crosslinking. Ultimately, this results in morphological defects of the palisade-like vitelline bodies.

While some genes required for VM production are transcribed during the early period of its formation (e.g., *VM26.A.1*, *VM34C* and *VM26A.2*) other genes such as *VM32E* are expressed later, at the end of this period (Swevers et al. 2005).

The chorion harbors a class of proteins with the chorion-3 superfamily domain including s36 and s38 (Pascucci et al. 1996). Initially, s36 is localized in the VM, but during chorion formation, s36 relocates to the chorion. Interestingly, s36 and related proteins are found only in a sub-group of dipterans excluding mosquitoes. This suggests rapid evolution of chorion composition and assembly in insects.

Regarding gene expression, while *s36*, *s38* and *femcoat* are expressed when the inner chorionic layer and endochorion are being produced, the genes *s15*, *s16*, *s18*, *s19* are expressed later, when the exochorion is secreted (Parks and Spradling 1987; Kim et al 2002). Some of those genes are clustered on chromosomes X and 3 and high levels of their expression are ensured by a process of gene amplification through local DNA replication (Swevers et al. 2005; Cavaliere et al. 2008).

One of the first genetically identified factors needed for chorion assembly involve the defective chorion-1 (*Dec-1*) (Hawley and Waring 1988; Waring et al. 1990). Mutations in *dec-1* gene in the fruit fly cause female sterility. The *Dec-1* locus codes for three alternatively spliced proproteins, c106, fc125, and fc177, that are processed in the extracellular space giving rise to five distinct proteins (Noguerón and Waring 1995; Noguerón et al. 2000). These proteins display a complex localization behavior. Some localize to the VM before they gradually penetrate into the chorion. Some others end up in the endochorionic spaces or enter the oocyte. The isoform fc177 was shown to affect the correct spatial localization of endochorionic proteins during assembly thereby controlling eggshell morphology. The domain structure of fc177 suggests that it is involved in formation of cavities in the tripartite endochorion (Mauzy-Melitz and Waring 2003). The function of Dec-1 is conserved within the *Drosophila* genus (Badciong et al. 2001). It is noteworthy that Dec-1 proteins were identified in mollusks of the genus *Aplysia* indicating that they are conserved among invertebrates (Cummins and Nagle 2005).

Eggs silenced for *femcoat* through dsRNA present a malformed endochorion where the pillars are absent or are sparse (Kim et al. 2002). There are other known genes coding for minor proteins required for eggshell formation (Swevers et al. 2005; Papantonis et al. 2015), as new putative genes associated with choriogenesis were recently described.

Further information regarding *D. melanogaster* eggshell proteins and genes was obtained through proteomic and transcriptome analysis. By mass spectrometry, Fakhouri et al. (2006) isolated 46 proteins in eggshell matrix preparations. Together with previously known eggshell factors and proteins (e.g., Dec-1, s36, s38, VM32E and VM34C) some new and unknown proteins were found. Moreover, microarray experiments with follicle cells during eggshell production identified 150 genes expressed specifically in this tissue (Tootle et al. 2011). Thirty of these genes code for known eggshell proteins such as Dec-1, s36 and VM34C, while another 19 are putative chorion genes. The remaining 100 genes were proposed to be involved in eggshell maturation. To evaluate the significance of these genes, their expression profiles were determined in wild-type and *peroxinectin-like* (*pxt*) mutant flies. In *pxt* ovaries, most of these genes were expressed prematurely. The authors conclude that Pxt, a cyclooxygenase, synchronizes egg maturation and eggshell production. These data, thus, indicate that the eggshell communicates with follicle cells thereby controlling its own production. The data obtained with the proteome and transcriptome analyses partially overlap, underlining the robustness of these approaches.

### 9.2.6.2 *Bombyx mori*

In *B. mori*, only two genes coding for VM proteins are described. The genes *BmVMP30* and *BmVMP90* are expressed at late vitellogenesis and early choriogenesis stages (when the VM is being produced) and their silencing by antisense oligoDNA affects the integrity of the follicular epithelium. Both proteins are localized specifically in the VM. *BmVMP90* shares only minor similarity to the *D. melanogaster* VM proteins sV17 and sV23 (Kendirgi et al. 2002; Sdralia et al. 2012). A third gene was putatively associated with VM formation: *BmEP80* is expressed in follicle cells at late vitellogenesis and early choriogenesis stages. RNAi for this gene resulted in eggs that collapsed during early embryogenesis and the hatching rate was affected when the eggs were kept at low relative humidity conditions (Xu et al. 2011). The proteins *BmEP80* and *BmVMP90* share 97.4% identity and they might be the same gene with strain polymorphisms (Sdralia et al. 2012). Another hypothesis is that these genes duplicated recently; the fact that both genes have a slightly different period of expression (Xu et al. 2011; Sdralia et al. 2012) favors this hypothesis.

The genes that are known to be involved in choriogenesis are classically located in two clusters in chromosome 2: Ch1-Ch2 and Ch3. These genes belong to the same superfamily of chorion genes that is subdivided in two branches, coding for A-type or B-type proteins (also named  $\alpha$  and  $\beta$  branches). The A-type branch is composed of the gene families *ErA*, *A* and *HcA*, and the B-type branch is composed of the gene families *ErB*, *B* and *HcB*. It is believed that all six gene families originated from a single common ancestor since their proteins have a conserved central domain. Many of these chorion genes occur in pairs within the chromosome: each *ErA* gene is paired with an *ErB* gene (*ErA/ErB*) and the same pattern occurs for *A/B* and *HcA/HcB* genes. Genes of a couplet are located in opposite strands with a common bidirectional promoter region of approximately 300 base pairs. The two genes in each pair are transcribed coordinately. Moreover, *ErA/ErB* genes are expressed during early choriogenesis while *A/B* and *HcA/HcB* genes are expressed during middle and late choriogenesis, respectively (Regier and Kafatos 1985; Lecanidou et al. 1986; Spoerel et al. 1989; Goldsmith 1989; Swevers et al. 2005; Papantonis et al. 2015; Chen et al. 2015a).

In a recent publication, the chorion locus of chromosome 2 was re-analyzed and 127 chorion genes were annotated (Chen et al. 2015b). These genes code for low-molecular weight proteins that are expressed during early (36 genes), mid (46 genes) and late (45 genes) stages of choriogenesis. They are arranged in clusters probably sharing distinct regulatory sequences. The late chorion proteins, which are particularly rich in cysteines (such as *HcA/HcB*), are needed for maturation of the chorion by crosslinking. Like in *D. melanogaster* (see above), the genes of this locus are expressed sequentially, and after expression of VM genes such as *BmVM30*.

### 9.2.6.3 Mosquitoes

In *A. aegypti* the following genes coding for vitelline membrane proteins were described: VMP 15-a1, 15a2, 15a3, AAEL006670, AAEL017471 and AAEL0017501, all of which contain the conserved hydrophobic domain common to members of the VMP family. While AAEL017471 is expressed with 48 h after blood meal (period related with exochorion formation) all the other genes are transcribed earlier, within 24–36 h after the blood meal, when the VM and endochorion are secreted (Clements 1992; Edwards et al. 1998; Marinotti et al. 2014). Since AAEL017471 is the only gene with late expression, it was postulated to have a similar function to *VM32* in *D. melanogaster*. In addition, putative cysteine rich chorion proteins (CRPs) that share distinct sequence signatures, odorant and chitin binding proteins (OBPs, CBPs) were isolated. CBPs suggest that chitin may play a role in the construction of the eggshell matrix (Sect. 9.2.9); OBPs are proposed to function as transporters of crosslinking substrates. Several enzymes previously suspected or characterized as eggshell factors including peroxidases, phenoloxidases, laccases, dopachrome conversion enzymes, and transglutaminases were also detected (Marinotti et al. 2014). In the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*, only two putative vitelline membrane genes are transcribed, AGAP002134-RA and AGAP008696-RA, at 24 h after blood meal (Amenya et al. 2010).

### 9.2.6.4 *Blattella germanica*

In *B. germanica* a suppression subtractive hybridization cDNA library found 34 sequences, with 15 homologs of known genes in other insects and 19 sequences without homology. Some of these 15 genes are putatively related with chorion formation, such as *yellow-g*, associated with VM crosslinking (Irles et al. 2009a). Two of the novel predicted genes, *Brownie* and *Citrus*, were further studied and found to be specifically transcribed between middle and late choriogenesis (Irles et al. 2009b; Irles and Piulachs 2011). *Brownie* is expressed in the whole follicular epithelium with a more concentrated expression in follicle cells located at the anterior pole. RNAi for this gene impairs the formation of the sponge-like body of the eggshell and the keel of the ootheca, structures with aeropyle and micropyle-associated functions. *Brownie* is also necessary for ootheca tanning: while control oothecae darken in 5–6 h, those silenced for *Brownie* takes 6–7 days to darken (Irles et al. 2009b). The *Citrus* protein is composed of a motif repeated 33 times that is rich in glycine, tyrosine, proline and glutamic acid residues but lacks cysteines. Females silenced for *Citrus* did not produce ootheca, the eggs are fragile, and while the eggshell has all layers both the endochorion and exochorion structures are compromised: endochorion pillars are taller while the external layers (outer endochorion with exochorion) are thinner when compared to normal eggs. A relation of *Citrus* with egg impermeability is also suggested (Irles and Piulachs 2011). Interestingly there are no sequences similar to *Citrus* deposited in public databases, suggesting that it might be confined to insect species with panoistic ovaries.

### 9.2.7 Regulation of Eggshell Gene Expression

Formation of the eggshell requires coordinated gene expression since the whole process takes place in a relatively short period and, as cited above, distinct genes are necessary for different eggshell layers. While the VM is produced at the end of the vitellogenesis stage, the other eggshell components are subsequently produced at the choriogenesis stage. This vitellogenesis to choriogenesis transition is regulated by changes in levels of ecdysteroids (Swevers et al. 2005; Papantonis et al. 2015). The formation of the VM is dependent upon 20-hydroxyecdysone signaling, as was demonstrated in *in vitro* assays with *B. germanica* and *A. aegypti* (Raikhel and Lea 1991; Belles et al. 1993). However, in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, *in vitro* assays showed that only juvenile hormone is needed to trigger the formation of the VM and other eggshell layers (Ramaswamy et al. 1990).

In *B. mori*, some *cis*-regulatory elements and transcription factors involved with chorion genes expression are known (Papantonis et al. 2015; Chen et al. 2015a). They regulate the temporal expression of chorion genes by repressing or activating the expression according to the choriogenesis stage. In the silkworm, CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs), which belong to b-ZIP (basic leucine zipper) transcription factor superfamily, regulates early and middle chorion gene expression while transcription factors of the GATA $\beta$  family are responsible for late chorion gene expression. Both C/EBPs and GATA transcription factors also regulates *D. melanogaster* chorion gene expression. (Sourmeli et al. 2005; Swevers et al. 2005; Papantonis et al. 2008, 2015). Despite such accumulated knowledge related to the regulation of chorion gene expression at the level of gene pair, however, our understanding of the global regulation of the chorion locus at the level of the chromosome remains elementary.

In *B. germanica*, chorion formation is related with epigenetic regulation. The trimethylation of histone 3 lysine 9 (H3K9me3) is mediated by the product of the gene *Windei*. RNAi for *Windei*, which appears to reduce H3K9me3 in the DNA of follicular cells, inhibits *Brownie*, *Citrus* and *Yellow-g* expression and prevents eggshell formation (Herraiz et al. 2014).

### 9.2.8 Stabilization, Sclerotization and Melanization of Eggshell Layers

Eggshell proteins are integrated into networks requiring enzymes that assist covalent protein association (i.e., crosslinking). These proteinaceous components are essentially stabilized by three crosslinking intermolecular phenomena: disulfide bridges, di- and tri-tyrosine covalent bonds, and quinone-based sclerotization. In eggs of certain insects like *A. aegypti*, tyrosine-based melanization occurs, a process that is partially similar to the sclerotization pathway (Chap. 6). While in some species such as *D. melanogaster* and the kissing bug *Rhodnius prolixus* these

crosslinking occurs before oviposition when eggs are still in the ovary, in other species such as mosquitoes this process occurs within 2 h after the eggs are laid, concomitantly with chorion melanization (Christophers 1960; Mindrinos et al. 1980; Margaritis 1985a). In addition to these covalent proteins associations, some eggshell proteins such as Dec-1 and the VM proteins are modified post-translationally and these modifications are necessary for eggshell stabilization.

### 9.2.8.1 Crosslinking via Disulfide Bonds

Crosslinking via disulfide bonds is common in stabilizing chorionic proteins that are relatively rich in cysteine residues (Kafatos et al. 1977). Stabilization of chorionic proteins in odonates, lepidopterans and coleopterans occurs mainly by disulfide bonds (Margaritis 1985a; Regier and Wong 1988). The reversible disulfide bonding by reductive enzymatic activity, which involves the evolutionary conserved cysteines in *D. melanogaster* VM proteins, suggests its role in retaining flexibility to ease mechanical pressures during oviposition (Wu et al. 2010).

### 9.2.8.2 Hardening via Di- and Tri-Tyrosine Crosslinking

A major class of enzymes related with eggshell stabilization are peroxidases. These enzymes catalyze oxidation of tyrosine residues that form di- and tri tyrosine bridges between extracellular chorion proteins leading to eggshell hardening. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is essential to trigger and carry out such crosslinking via interaction of tyrosine radicals formed by one electron oxidation of neighboring tyrosine residues on proteins (Chapman 2013).

Peroxidase activity was detected in *D. melanogaster* chorions (Mindrinos et al. 1980; Keramaris et al. 1991). The peroxidase Pxt is localized specifically in the ICL and the floor of the endochorion (Margaritis 1985b; Konstandi et al. 2005). Hydrogen peroxide is produced and secreted by follicular cells at the final stage of oogenesis and Pxt enzymatic activity is proposed to be important for di- and tri-tyrosine formation that occurs during chorion hardening (Margaritis 1985b; Margaritis and Keramaris 1991).

Di and tri-tyrosine were detected in chorion hydrolysates of *A. aegypti*, and peroxidase, which was released from chorion layers, was analyzed using tyrosine and hydrogen peroxide (Li et al. 1996). *A. aegypti* chorion peroxidase was isolated, purified and characterized as a heme protein (Han et al. 2000a; 2000b), and its partial peptide sequence was determined (Li et al. 2004). Crosslinking mediated by chorionic peroxidase in the mosquito occurs after oviposition (Li and Li 2006). Recently, three chorion peroxidases were identified in this mosquito (Marinotti et al. 2014).

In *R. prolixus*, the *Dual oxidase (Duox)* gene encodes a membrane-bound enzyme present in the follicle cells that contains both peroxidase and NADPH oxidase domains. Duox is responsible for generating hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) that

enables eggshell hardening through protein crosslinking by di-tyrosines. *RpDuoX*-silenced eggs did not produce  $H_2O_2$  resulting in a decrease of eggshell hardening that lead to egg dehydration in low relative humidity conditions (Dias et al. 2013).

In the olive fruit fly *Bactrocera oleae* immunolocalization assays showed the presence of a chorion peroxidase in the VM and other eggshell structures in late choriogenesis (Konstandi et al. 2006). Peroxidase activity was also histochemically or cytochemically detected in chorions of *D. virilis* (Trogakos and Margaritis 1998a), *E. amygdali* (Mouzaki and Margaritis 1994) and *An. gambiae* (Amenya et al. 2010).

### 9.2.8.3 Sclerotization

Egg chorion sclerotization was extensively studied in *A. aegypti* (Li 1994). Hardening of mature eggs, which takes place immediately after oviposition, involves a catecholamine cascade pathway (the sclerotization process is detailed in Chap. 6). A fully sclerotized chorion of *A. aegypti* eggs is important to confer physical protection for the developing embryo (Li et al. 2004). Tyrosine is hydroxylated to dopa and dopa is decarboxylated through the action of dopa decarboxylase forming dopamine. Dopamine can be acetylated by two distinct enzymes forming *N*-acetyldopamine (NADA) and *N*- $\beta$ -alanyldopamine (NBAD). NADA and NBAD can be further oxidized giving rise to reactive quinones that interact with nucleophilic groups to crosslink structural chorionic proteins (Hopkins and Kramer 1992). The presence of dopa decarboxylase required for eggshell sclerotization in another mosquito species, *Anopheles albitarsis*, was shown by Monnerat et al. (1999). This process of hardening that involves dopa decarboxylase is induced by ingestion a blood meal (Li 1994). Additionally to the above enzymes, laccase2 as one of phenoloxidase enzymes is highly expressed in the common house mosquito *Culex pipiens* eggs (Pan et al. 2009) and it is induced in the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* females after blood ingestion (Wu et al. 2013). Laccase2 is fundamental for both chorion melanization and sclerotization in *Aedes albopictus* (Wu et al. 2013).

### 9.2.8.4 Melanization

Melanization process of *A. aegypti* eggs, which initiates a dramatic change of colors from white to almost black within 90 min after oviposition (Li and Li 2006), is mediated by an alternative biochemical route. Both dopa and dopamine can be oxidized by phenoloxidase to dopaquinone and dopaminequinone, respectively. Dopaquinone and dopaminequinone are cyclized to form dopachrome and dopaminechrome on the long and complex pathway to form polymeric melanin (Li 1994). In the pathway of catecholamine metabolism, dopa decarboxylase is required for both sclerotization and melanization (see Chap. 6 for more details). As described above, dopa, which is the phenoloxidase-catalyzed hydroxylation product of

tyrosine, is decarboxylated to dopamine by dopa decarboxylase (Schlaeger and Fuchs 1974; Ferdig et al. 1996; Margaritis 1985a). Based on genome and transcriptome sequencing, enzymes such as peroxidase, phenoloxidase, laccase and dopachrome conversion enzymes were detected in *An. gambiae* (Amenya et al. 2010). These same catalytic proteins, which are known to be involved in sclerotization and melanization, were recently identified in eggshell chorion layers of *A. aegypti* (Marinotti et al. 2014).

#### 9.2.8.5 Post-translational Modification

The enzymes Pipe and Nudel that play an essential role in *D. melanogaster* dorso-ventral patterning, are also important for eggshell assembly (LeMosy and Hashimoto 2000; Zhang et al. 2009). VM32E and Palisade depend on the sulfotransferase activity of Pipe (Zhang et al. 2009). Proteolytic processing of sV17 and sV23 depends on the protease activity of Nudel (LeMosy and Hashimoto 2000) that was also identified in the proteomics approach by Fakhouri et al. (2006). The proteases processing other proteins such as Dec-1 await identification.

#### 9.2.9 Is There Chitin in the Eggshell?

Chitin is a major and essential component of invertebrate cuticular or peritrophic membrane matrices. In Chaps. 2, 3 and 8, the role of chitin in these structures is extensively described. In the crustacean *Daphnia magna* resting eggs, chitin was claimed to be detected suggesting that it may be a common component of arthropod eggshells (Kaya et al. 2013). A protein similar of peritrophins that binds to midgut chitin fibers was identified during oocyte development in the marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (Khayat et al. 2001). In insects, genes expressing chitin-binding proteins were identified in the follicle cells of *R. prolixus* (Medeiros et al. 2011) and *A. aegypti*. In this mosquito species, proteins with chitin binding domains or chitinase domains were found as constituents of the eggshell (Sect. 9.2.6.3) (Marinotti et al. 2014). These data allow a speculation that chitin is an important scaffold material in eggshells like it is in the cuticle. The eggshell of *A. aegypti* was reported to contain a chitin-like polysaccharide (Moreira et al. 2007). However, the authors do not exclude the possibility that the detected chitin is from the serosal cuticle in *A. aegypti*, as this mosquito as well as others have chitin in their serosal cuticle (Sect. 9.3.5) (Rezende et al. 2008; Goltsev et al. 2009; Farnesi et al. 2015). Essentially however, a direct and biochemical evidence for eggshell chitin is lacking.



### 9.3 Cuticular Egg Envelopes of Arthropods

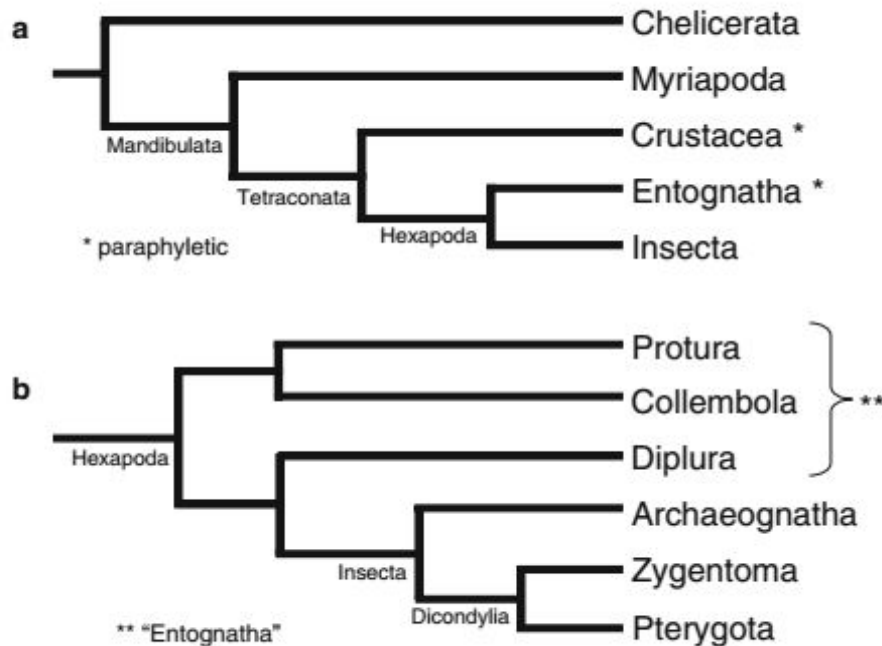
As stated on Sect. 9.1, after being laid, eggs of arthropods must deal with a myriad of biotic and abiotic challenges that can be stressful or lethal, such as pathogen attack or temperature variations. For those species without parental care, their eggs must rely on the protection conferred solely by the eggshell maternal layers. However, during early embryogenesis a cuticular egg envelope (a composite extracellular matrix named blastodermal cuticle or serosal cuticle) is produced in many species. Blastodermal or serosal cuticles will enhance or, sometimes substitute the protection conferred by the maternal eggshell layers.

The formation of these extracellular matrices is tightly associated with the early stages of arthropod embryogenesis. After fertilization the newly formed zygote nuclei divides and, depending on the species, such divisions can be followed by total (holoblastic), partial (meroblastic) or no cleavage of the cytoplasm (when energids are formed). In all cases, a uniform cellular blastoderm is eventually formed. Subsequently the blastoderm differentiates giving rise to two anlagen: the extraembryonic and the embryonic regions. The extraembryonic region in insects is named serosa and a second extraembryonic tissue arises from the embryonic margin of this group of animals: the amnion (Fig. 9.1). While the blastodermal cuticle is produced by either the uniform or the differentiated blastoderm, the serosal cuticle is solely produced by serosal cells. Further information related to arthropod embryogenesis and extraembryonic membranes can be found elsewhere (e.g., Jura 1972; Anderson 1973; Gilbert and Raunio 1997; Chapman 1998; Machida and Ando 1998; Panfilio 2008).

During late embryogenesis some species produce embryonic cuticles, (i.e. cuticles secreted by the proper embryo) (Tiegs 1940; Dorn 1976; Konopová and Zrzavý 2005). These cuticles are shed prior to the synthesis of the nymphal/larval cuticle, which are addressed in Chap. 3.

#### 9.3.1 Phylogenetic Relationships Among Arthropods

For a proper explanation of arthropod cuticular egg envelopes, a brief phylogenetic description is necessary. Arthropoda is a monophyletic clade comprised of four living groups: Chelicerata, Myriapoda, Crustacea and Hexapoda. Current views indicate that crustaceans are a sister group of hexapods and both constitute the clade Tetraconata (= Pancrustacea). Myriapods are the sister group of Tetraconata and both are named Mandibulata and accordingly, Chelicerates are the sister group of Mandibulata (Fig. 9.4a). The hexapods are constituted of the paraphyletic Entognatha, comprised of Collembola, Protura and Diplura, and the monophyletic Insecta (= Ectognatha) (Budd and Telford 2009; Regier et al. 2010; Giribet and Edgecombe 2012; Misof et al. 2014). Within insects, Archaeognatha is the sister



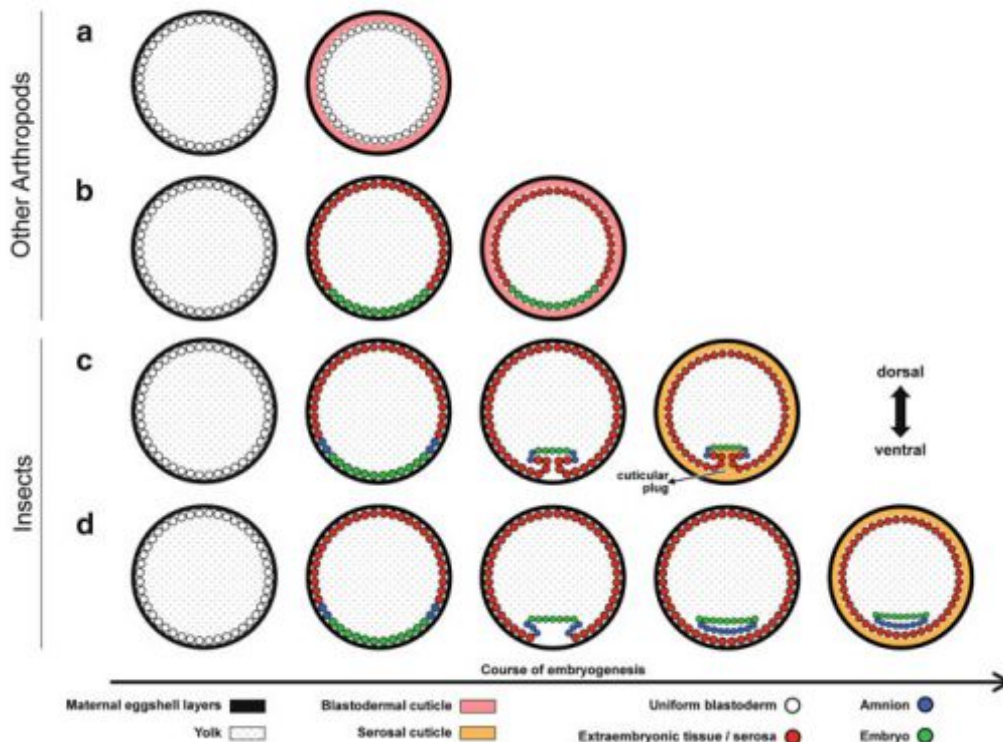
**Fig. 9.4** Arthropod phylogeny. Current scheme of phylogenetic relationships among (a) arthropods and (b) hexapods. Based on Regier et al. 2010; Giribet and Edgecombe 2012; Misof et al. 2014. Crustaceans and entognathans are considered as paraphyletic taxa

group of Dicondylia while in Dicondylia the wingless Zygentoma is the sister group of all winged insects (Pterygota) (Misof et al. 2014) (Fig. 9.4a, b).

### 9.3.2 Blastodermal Cuticle in Non-insect Arthropods

In arthropods belonging to the Chelicerata, Myriapoda, Crustacea and Entognatha groups, the presence of a blastodermal (also blastoderm or blastodermic) cuticle is described. While in some species the blastodermal cuticle is produced by the uniform blastoderm (Fig. 9.5a), in other species this cuticle is produced by the differentiated blastoderm (extraembryonic tissue+embryo) (Fig. 9.5b) (Jura 1972; Machida 2006). There are few descriptions of blastodermal cuticles in chelicerates, myriapods and crustaceans. Identification of this structure in some cases (especially in crustaceans) is difficult due to lack of nomenclature standardization (Anderson 1973; Machida et al. 2002).

In chelicerates a blastodermal cuticle was described in a *Xiphosura* horse-shoe crab (Sekiguchi 1960 quoted in Anderson 1973). In myriapods from the classes diplopods, symphyla and pauropods the blastodermal cuticle is described as “thin but highly resistant” and “is a major barrier to the penetration of reagents into the egg during histological treatment” (Anderson 1973). Tiegs (1940) states that the blastodermal cuticle of *Hanseniella agilis* is “impermeable to watery stains” and the



**Fig. 9.5** Dynamics of cuticular egg envelope formation during early embryogenesis in arthropods. Schematic drawing of embryonic cross-sections. (a) In Chelicerata, Myriapoda, Crustacea and Entognatha a blastodermal cuticle is produced by the cells of the uniform blastoderm or (b) cells of the differentiated blastoderm, comprising the embryo and the extraembryonic region (named serosa by some authors). (c) In Archeognatha and occasionally in *Zygentoma* after blastoderm differentiation the embryo sinks into the yolk but the serosa does not fuse ventrally. In this case, a serosal cuticle with a cuticular plug is produced. (d) In Pterygota and often in *Zygentoma*, after the embryo sinks into the yolk the serosa fuses ventrally and a uniform serosal cuticle is secreted. For the sake of simplicity, the primary dorsal organ is not depicted. Inspired in schemes presented by van der Zee et al. 2005 and Machida 2006

one from *Paupopus silvaticus* (Tiegs 1947) is “a very thin and perfectly smooth membrane, without any surface-sculpture. Unlike the chorion, it resists boiling with caustic soda” suggesting the presence of chitin (Campbell 1929). There is also the description of a blastodermal cuticle in chilopods (Knoll 1974, quoted in Machida and Ando 1998) and in crustaceans, a blastodermal cuticle was described in some species (Machida et al. 2002), including the parasitic pentastomid *Raillietiella sp.* (Stender-Seidel and Thomas 1997).

Regarding entognathans (Collembola, Protura and Diplura), the blastodermal cuticle is better described in collembolans. Jura (1972) and Anderson (1973) mention the existence of a blastodermal cuticle in a vast number of collembolan species. In some species, a second, or even third or fourth blastodermal cuticles are produced and, in many species, the chorion ruptures after blastodermal cuticle formation (Jura 1972). In the giant springtail *Tetradontophora bielensis*, the first blastodermal cuticle is relatively thin and smooth, while the second blastodermal cuticle is

wrinkled. After formation of both cuticles the chorion ruptures, and then, the vitelline membrane becomes the outermost eggshell layer (Jura et al. 1987). In *Tomocerus ishibashii* the smooth chorion is ruptured by the formation of a highly sculptured first cuticle (with four spines at the dorsal side of the egg and the occurrence of many button, cone and seta-like projections throughout the majority of its surface). Later, a smooth and thinner second cuticle is also formed (Uemiya and Ando 1987). Description of embryonic aspects in Protura, however, are very scarce (Jura 1972), and a single investigation depicts *Baculentulus densus* (Fukui and Machida 2006; Machida 2006) in which the secretion of the blastodermal cuticle is described occurring right after blastoderm differentiation. Regarding diplurans, Tiegs (1942) describes the presence of a blastodermal cuticle in *Campodea fragilis* but does not mention its formation process. A detailed account of blastodermal cuticle formation in the two-pronged bristletail *Lepidocampa weberi* is given by Ikeda and Machida (2001) where this cuticle has diverse alternating regions with differing electron density that resembles the insect serosal cuticle structure (Sect. 9.3.4).

### 9.3.3 Presence and Formation of Serosal Cuticle in Insects

Given that species from all non-insect arthropod clades produce a blastodermal cuticle, the production of a cuticle solely by the extraembryonic serosa is considered an insect innovation (apomorphy). This could have occurred due to the loss of capacity to secrete a cuticle by undifferentiated blastoderm cells or embryonic cells of the differentiated blastoderm (Machida and Ando 1998). Therefore it is necessary that serosal cells envelop the embryo in order to synthesize its cuticle (see below).

Serosal cuticle descriptions were reported in species of the following insect orders: Archaeognatha (Machida et al. 1994), Zygentoma (Masumoto and Machida 2006), Ephemeroptera (Tojo and Machida 1997), Zoraptera (Mashimo et al. 2014), Dermaptera (Chauvin et al. 1991) Plecoptera (e.g., Miller 1939, 1940), Orthoptera (e.g., Slifer 1937), Grylloblattodea (Uchifune and Machida 2005), Embioptera (Kershaw 1914), Phasmatodea (Jintsu et al. 2010), Isoptera (Striebel 1960 quoted in Anderson 1973), Thysanoptera (Heming 1979; Haga 1985), Hemiptera (e.g., Miura et al. 2003), Psocodea (Hinton 1977), Coleoptera (e.g., Lincoln 1961), Lepidoptera (e.g., Chauvin and Barbier 1979) and Diptera (e.g., Beckel 1958).

After blastoderm differentiation, the embryo rudiment sinks into the yolk and the serosa completely wraps the embryo, and forms its cuticle. However, in Archaeognata the serosa does not fuse beneath the embryo and a cuticular plug is produced (Machida et al. 1994) (Fig. 9.5c). With the exception of Zygentoma, the serosa in all other dicondylarian insects (i.e. the pterygotes, see Fig. 9.4b) becomes a continuous sheet that secretes a uniform cuticle (e.g., Machida 2006) (Fig. 9.5d). In the silverfish *Lepisma saccharina* (Zygentoma) an interesting feature was described: while in 68% of analyzed embryos a continuous cuticle is present (Fig. 9.5d), in 32% of

them the serosa does not fuse ventrally and then a cuticular plug is present, as in Archaeognatha (Fig. 9.5c) (Masumoto and Machida 2006).

Although serosal cuticle presence occurs throughout insect taxons, some species lack this structure. The most conspicuous example is *D. melanogaster*, which does not possess serosa and amnion but rather a derived amnioserosa and no serosal cuticle (Panfilio 2008). The amnioserosa (and lack of serosal cuticle) evolved in the higher Cyclorrhapha (Schizophora) lineage (Schmidt-Ott 2000; Rafiqi et al. 2008). Exceptions also occur in hemipteran species like the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* that despite having serosa and amnion, does not produce a serosal cuticle (Dorn 1976). The sexually-produced eggs of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* have a serosal cuticle, whereas the parthenogenetic embryos, which develop within the ovarioles of the mother, have a reduced serosa and lack a serosal cuticle (Miura et al. 2003).

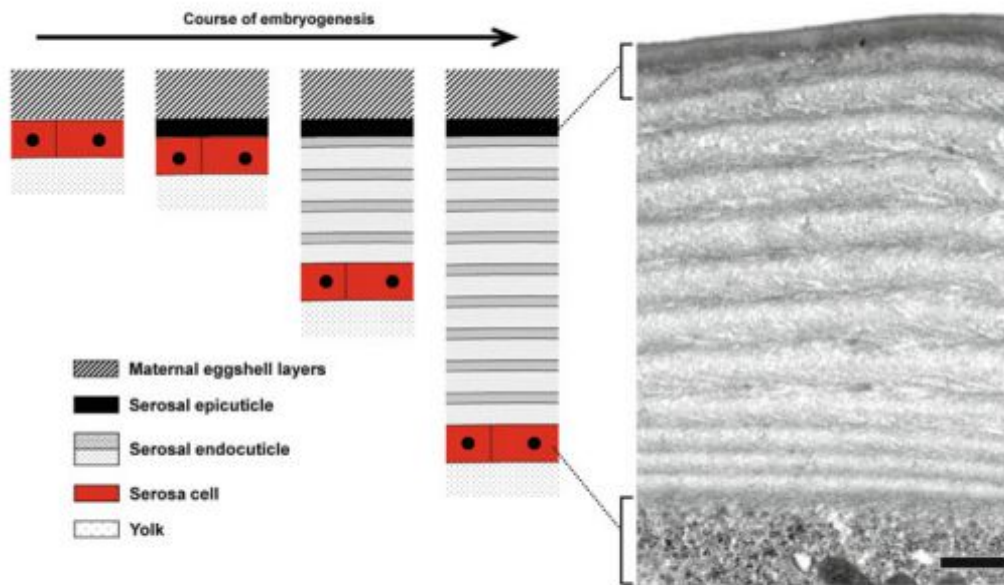
In the tobacco hornworm *Manduca sexta*, the serosa produces another extracellular matrix, the serosal membrane, after the serosal cuticle secretion is completed (Lamer and Dorn 2001). The authors describe this membrane as possessing uncommon physical characteristics being “tough, rubbery” and “extremely elastic, tear-proof and somewhat gluey”.

### 9.3.4 Serosal Cuticle Structure

Contrary to the extensive description of serosal cuticle existence throughout the class Insecta, a detailed characterization of its structure can be found in species confined to few orders: Archaeognatha, Dermaptera, Orthoptera, Coleoptera and Lepidoptera.

According to Machida and Ando (1985) and Machida et al. (1994), the serosal cuticle of the archeognathan *Pedetontus unimaculatus* is a three-layered structure. It is important to mention that in the Machida and Ando communication, these serosal cuticle layers are misnamed ‘blastodermic cuticles’. The first layer is 2–4  $\mu\text{m}$  thick and is deposited facing the chorion. It is initially light brown and darkens, changing the egg color from orange to dark brown probably due to melanization (Sects. 9.2.8.4 and 9.3.5, Chap. 6). The apical surface has polygonal structures with pointed processes at the center of each polygon. A hyaline sheet named coating layer is deposited at the apical surface of this first layer. Subsequently, the electron-lucent homogeneous second layer of 4–8  $\mu\text{m}$  thickness is deposited below, followed by a 5–10  $\mu\text{m}$  thick third layer. The third layer has a laminar organization similar to the one found in the serosal endocuticle of other insects (see below). The cuticular plug is comprised of the second and third layers of the serosal cuticle (Machida and Ando 1985; Machida et al. 1994).

In most pterygotes, the serosal cuticle is comprised of a thin outermost epicuticle with a thickness of about 1  $\mu\text{m}$  and a thick lamellate and fibrous endocuticle (also named procuticle), synthesized after epicuticle formation (Fig. 9.6), with thickness ranging from 1.6 to 22  $\mu\text{m}$ , depending on the species. It is worth mentioning that



**Fig. 9.6** Structure and dynamics of serosal cuticle deposition in pterygote insects. *Left*: Cartoons depicting the stepwise secretion of serosal cuticle layers. A thin epicuticle is produced below the maternal eggshell layers produced during oogenesis. Subsequently, a thick endocuticle composed of various lamellae is gradually deposited. *Right*: Transmission electron micrograph of a serosal cuticle from *Tribolium castaneum* composed of 12 endocuticle sheets (courtesy of M. van der Zee). Other endocuticle lamellae will be further added as embryogenesis progresses. Scale bar=0.5  $\mu\text{m}$

Eleanor Slifer, in her seminal communication from 1937, named the serosal epicuticle and endocuticle, respectively, ‘yellow cuticle’ and ‘white cuticle’. The serosal epicuticle and endocuticle resemble the epicuticle and procuticle layers of post-embryonic integuments of insects (Chap. 3) (Chapman 1998). Apart from these similarities, the epicuticle structure varies among species, as well as the thickness of both serosal epicuticle and endocuticle (Table 9.1). In all cases observed, the endocuticle is comprised of a stratified, lamellate structure with regions of alternating electron densities. Number of lamellae varies between 7 and 90, and layer thickness may differ in a single species, depending on the methodology of sample preparation and analysis (see the case with the house cricket *Acheta domesticus*, Table 9.1).

In *R. prolixus* a thin layer of less than 1  $\mu\text{m}$  thick is produced by the serosa (Beament 1949). The author names it the “epembryonic membrane” but its description falls within serosal epicuticle depictions reported in other species. The endocuticle is the only serosal cuticle layer that contains chitin (see below), and it seems that this bug lacks this layer: an analysis of chitin presence or formation through dye labeling, gene expression and gene silencing indicates that the first chitin-containing cuticle produced during *R. prolixus* embryogenesis is an embryonic cuticle (Souza-Ferreira et al. 2014). The presence of a two-layered serosal cuticle has not been described in mosquitoes, although preliminary results indicate that this is indeed the case (Beckel 1954; Farnesi, personal communication).

**Table 9.1** Physical features of serosal cuticle layers from pterygote insects

Order	Species	Epicuticle		Endocuticle		Reference
		Thickness (µm)	Details	Thickness (µm)	Lamellae number	
Dermoptera	<i>Forficula auricularia</i>	0.02	–	2	–	Chauvin et al. (1991)
Orthoptera	<i>Melanoplus differentialis</i>	1	Two regions, innermost very thin (0.02 µm) and very electron dense	15–20	≥14	Slifer (1937); Slifer and Sekhon (1963)
	<i>Acheta domesticus</i> <sup>a</sup>	0.4	–	8–10	–	McFarlane (1960)
	<i>Acheta domesticus</i> <sup>b</sup>	0.1	Five regions, alternating electron lucent and electron dense zones	22	30–40	Furneaux et al. (1969)
Lepidoptera	<i>Manduca sexta</i>	0.3	An outer electron dense region and an inner electron lucent region	2	7–9	Lamer and Dorn (2001)
Coleoptera	<i>Listronotus oregonensis</i>	n.m.	–	10–13	90	Nenon et al. (1995)
	<i>Tribolium castaneum</i>	0.4	An outer electron dense region and an inner electron lucent region	1.6	14	Chaudhari et al. (2015)

<sup>a</sup>Observed through frozen sections and light microscopy

<sup>b</sup>Observed through electron microscopy

n.m. not mentioned

### 9.3.5 Serosal Cuticle Biochemical Constitution

The serosal epicuticle contains protein and is generally believed to be also composed of lipids and waxes, whereas the serosal endocuticle is made of chitin and proteins. Most likely, sclerotization-related substances are also present in both layers. There is little definitive evidence regarding serosal cuticle composition, although recent genetic evidences corroborate earlier descriptions.

The serosal epicuticle of *A. domesticus* is considered as a ‘lipoid layer’, since it is hydrophobic, stains with Sudan dyes and is intensely osmiophilic (McFarlane 1960; Furneaux et al. 1969). It contains proteins that after hydrolysis yield all aminoacids except methionine, hydroxyproline and tryptophan. It is noteworthy that “readily available” amounts of phenylalanine and tyrosine are observed (McFarlane 1962), whereas these are precursors of both melanization and sclerotization pathways (Chap. 6, Hopkins and Kramer 1992). The serosal epicuticle of *R. prolixus* (epembryonic membrane, see above) is described as being “probably proteinaceous with tanning substances” and impregnated with a wax-like substance (Beament 1949). Indirect evidence suggests that *A. aegypti* serosal cuticle contains a wax layer (Harwood and Horsfall 1959).

The serosal endocuticle of *A. domesticus* contains proteins with amino acid composition similar to the one observed for its epicuticle (McFarlane 1962). Chitin presence in the serosal endocuticle has been described in two orthopteran species, the differential grasshopper *Melanoplus differentialis* and *A. domesticus*, through chemical procedures that reacted positive to chitin (Campbell 1929; Jahn 1935; McFarlane 1960). However, due to inconsistency among different methods, Jahn raises the issue about chitin specificity of these methods (Jahn 1935). In any case, gene silencing experiments confirmed chitin presence in *T. castaneum* serosal endocuticle (see below) (Jacobs et al. 2013). Although not being localized specifically to its endocuticle, chitin presence in the serosal cuticle is mentioned in zygentoman species (Jura 1972) and detected in mosquitoes of the genera *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* through chemical methods or lectin labeling (Beckel 1958; Rezende et al. 2008; Goltsev et al. 2009; Farnesi et al. 2015).

In the orthopterans *A. domesticus* and the two-striped grasshopper *Melanoplus bivittatus* the molecules dopa, dopamine and NADA, related with both melanization and sclerotization pathways (Sects. 9.2.8.3 and 9.2.8.4, Chap. 6) (Hopkins and Kramer 1992) are exclusively found in the serosal cells and the serosal cuticle. However, their specific presence in either serosal epicuticle or endocuticle was not investigated (Furneaux and McFarlane 1965a, b). The serosa and serosal cuticle of *A. domesticus* also possess an enzyme that can melanize both structures, when stimulated (McFarlane 1960). Since the serosa and serosal cuticle of this cricket do not darken, this enzyme might physiologically participate in the sclerotization pathway.

Finally, gene expression analyses in *An. gambiae* and *T. castaneum* also point to the presence of chitin, wax-like and tanning agents in serosal cuticle composition (see below).

### 9.3.6 *Hormonal and Genetic Processes Related with Serosal Cuticle Formation*

Ecdysteroids are involved in serosal cuticle formation, similarly to their involvement in post-embryonic cuticle synthesis (Chapman 1998). Follicle cells of the migratory locust *Locusta migratoria* produce ecdysteroids during ovarian



development. These are introduced into the oocyte as inactive conjugated polar compounds (Lagueux et al. 1977). At the onset of serosal cuticle formation, there is a peak of expression of ecdysone (an active form of ecdysteroid) in serosal cells (Lagueux et al. 1979). Most likely, ecdysone autocrinally triggers cuticle production in serosal cells (Goltsev et al. 2009). Descriptions of effector genes expression in the serosa are few and recent (see below). In a broad sense, the molecular evidence corroborates previous biochemical findings that the serosal cuticle is composed of lipids or wax, chitin, proteins and sclerotization-related molecules. However, structural evidence exists only for the presence of chitin.

The first report of a gene putatively associated with serosal cuticle formation is *Chitin synthase 1* (also named *Chitin synthase A*) in the mosquito *A. aegypti*. This gene is related to chitin production (Moussian et al. 2005a) and has two alternative splicing forms: *Chs1a* and *Chs1b*. While both splice forms are expressed at late embryogenesis for larval cuticle synthesis, only *Chs1a* is expressed in eggs at the moment of serosal cuticle formation (Rezende et al. 2008). Beyond that, information regarding genes associated with serosal cuticle production comes from studies carried out in *An. gambiae* and *T. castaneum*.

During early *An. gambiae* embryogenesis, prior to the secretion of its cuticle, the serosa gets intimately associated with the endochorion. After egg fixation the eggshell-associated serosa is manually separable from the embryo. A microarray gene expression profile comparison of these two isolated samples (embryo and serosa), identified 359 candidate transcripts as being “serosa-specific” (Goltsev et al. 2009). In the same study, *in situ* hybridizations confirmed serosal expression of the following genes: *Chs1*, *serpentine* – related with chitin microfibrils organization (Luschnig et al. 2006), *Dopa decarboxylase* and *Tyrosine hydroxylase* – related both with sclerotization and melanization pathways (Hopkins and Kramer 1992), and *Elovl*, presumably related with wax production (Vasireddy et al. 2007). The expression of *knickopf* (*knk*), necessary for proper chitin deposition (Moussian et al. 2006), was evaluated throughout *An. gambiae* embryogenesis (Goltsev et al. 2009). It was suggested that *knk* is expressed in the serosa of this mosquito, and later, this was confirmed in *T. castaneum* (see below). Most of the cuticle genes detected in *An. gambiae* serosa present a biphasic expression: at early embryogenesis, related with serosal cuticle formation and at late embryogenesis, associated with larval cuticle synthesis. The existence of a cuticle gene battery employed for the production of both cuticles during embryogenesis was suggested. This gene battery would also be used for post-embryonic cuticle production (Goltsev et al. 2009).

It is possible to silence *T. castaneum* genes in the egg through dsRNA-mediated RNAi targeted against the desired transcript (van der Zee et al. 2005). With this approach the following cuticle-related genes were silenced in the egg: *Chs1*, *Knk1*, *retroactive* (*rtv*), important for the correct organization of chitin filaments (Moussian et al. 2005b) and *Laccase2* (*Lac2*), related with melanization and sclerotization (Arakane et al. 2005). Absence of *Chs1* affects the inner serosal cuticle layer: instead of the organized lamellate structure, the serosal endocuticle becomes an amorphous layer, most likely composed solely of structural proteins (see below). Absence of *Knk1* and *Rtv* shows a similar pattern but in these cases the amorphous

serosal endocuticle might also contain disorganized chitin molecules. In all cases the serosal epicuticle remains intact (Jacobs et al. 2013, 2015; Chaudhari et al. 2015). *Lac2* silencing does not affect neither serosal epicuticle nor endocuticle structures although it interferes with the serosal cuticle physiological role (see below) (Jacobs et al. 2015).

It is feasible to generate *T. castaneum* eggs without a serosa through RNAi aiming the transcription factor *zerknüllt 1* (*Zen1*) (van der Zee et al. 2005). These serosa-less eggs do not produce a cuticular egg envelope but develops normally and are viable under standard conditions (Jacobs et al. 2013). A comparison between the transcriptome profile of late embryos with and without serosa was performed (Jacobs et al. 2015). Twelve genes coding cuticular proteins that are putatively associated with serosal cuticle formation were identified: three proteins annotated as “cuticle protein-like”, seven proteins containing peritrophin domains and two new uncharacterized proteins containing chitin binding motifs.

### 9.3.7 Physiological Role of the Serosal Cuticle

Serosal cuticle formation is related to water balance alterations in insect eggs. There are differences regarding how the dynamics of egg water flow occurs among species, one of the aspects being if extra water is required for egg development after it is laid (Wigglesworth 1972; Hinton 1981). In any case, the general perspective is the same: complete serosal cuticle formation leads to a decrease in egg water permeability.

Eggs of some species are laid in moist environments, but during early embryogenesis they do not absorb water. In crickets and grasshoppers the egg commences to uptake water and increases in length, width, volume and weight only after the serosa surrounds the developing embryo (McFarlane and Kennard 1960; Chapman 1998; Donoughe and Extavour 2015). The rate of water loss increases considerably during this period if eggs are transferred to desiccating conditions. The period associated with water uptake is concomitant with serosal cuticle generation: serosal endocuticle complete formation and serosal cuticle sclerotization coincide with the finalization of the egg water absorption phase and the decrease of water loss rate under desiccating conditions (McFarlane 1960; Hinton 1981; Chapman 1998). In some insect species, egg expansion causes the chorion to crack and the vitelline membrane becomes the outermost egg envelope (Wigglesworth 1972; Hartley 1962; Hinton 1981), similar to the chorion rupture that occurs with some collembolans (see Sect. 9.3.2). With respect to lepidopteran species, a similar pattern was described in the fairy moth *Nemophora albi antennella* (Kobayashi 1998): commencement and finalization of egg water uptake are correlated with serosal envelopment of the embryo and complete formation of the serosal cuticle, respectively.

Eggs of other insect species are laid in moist environments and water uptake starts way before the serosa surrounds the embryo. Water uptake in eggs of the Devil's coach-horse beetle *Ocytus olens* commences shortly after they are laid. The

water uptake period ceases with serosal cuticle formation and, under desiccating conditions, this cuticle diminishes egg water loss (Lincoln 1961). Mosquito eggs commence to uptake water promptly after being laid (Kliewer 1961). If during this period eggs are transferred into a dry environment, they shrink in few minutes and the embryo dies (Valencia et al. 1996; Rezende et al. 2008; Goltsev et al. 2009). After serosal cuticle production, water no longer enters the egg and water loss susceptibility decreases considerably (Kliewer 1961). Serosal cuticle formation in mosquitoes is associated with the egg capacity to survive under dry conditions (Rezende et al. 2008; Goltsev et al. 2009). However, the degree of egg viability outside water varies among species, from few hours to months (Vargas et al. 2014, Farnesi et al. manuscript in preparation). Higher chitin content in mosquito serosal cuticle seems to be correlated with higher egg viability under desiccating conditions, yet other factors might also play a role in viability differences (see below) (Farnesi et al. 2015).

The serosal cuticle also increases the resistance to desiccation in species that lay eggs in relatively dry environments. In these cases, analyses are performed under artificial conditions such as (i) submitting eggs to temperatures above 40 °C to evaluate the critical temperature when wax layers (a major component limiting water loss) melts, or (ii) keeping eggs at extreme desiccating conditions, such as a 5 % relative humidity (Hadley 1994; Chapman 1998). In *R. prolixus* the desiccating critical temperature raises from 42.5 °C to 68 °C after the wax-impregnated serosal epicuticle (epembryonic membrane) is formed (Beament 1949).

While all the above reports present circumstantial evidences suggesting the physiological role of serosal cuticles in increasing egg resistance to desiccation, none present functional proofs. Recently, however, RNAi experiments in *T. castaneum* paved the way to carefully confirm serosal cuticle function and the genes related with it. Silencing of *Zen1*, *Chs1*, *Knk1* and *Rtv* leads to distinct levels of serosal cuticle disruption and egg viability. When *Zen1* and *Chs1* RNAi eggs are kept at 5 % relative humidity, the respective viability is 5 % and 30 % while about 67 % viability was recorded in *Knk1*- and *Rtv*-silenced eggs kept at the same humidity. Control eggs present 80-90 % viability (Jacobs et al. 2013, 2015). These differences are probably associated with the role of each gene: without *Zen1* there is neither serosa nor serosal cuticle; in eggs lacking *Chs1* both serosa and serosal cuticle exists, but are devoid of chitin; without *Knk1* and *Rtv*, serosa and serosal cuticle occurs, but most likely with disorganized chitin fibrils. The viability difference found between *Zen1* and *Chs1* RNAi eggs might be due to the presence of the serosal cells, that may have an active role in water balance, or to other serosal cuticle constituents, such as the proteins of the endocuticle or the components of the serosal epicuticle, that are not affected (Jacobs et al. 2013). Silencing of *Lac2* under desiccating conditions also led to an egg viability of about 70 % (Jacobs et al. 2015). Although the sclerotization driven by Laccase2 might be relevant for serosal cuticle formation and role against desiccation, its relevance in chorion formation; or both chorion and cuticle, should also be considered.

Apart from water balance, the serosal cuticle seems to be involved in egg protection against predators. While freshly laid embryos of *M. sexta* are predated by the slit bug *Jalysus spinosus*, later ones become sheltered from this attack. Formation of

the serosal cuticle and the serosal membrane (Sect. 9.3.3) coincides with the inability of *J. spinosus* to predate the egg (Elsey 1972).

## 9.4 Concluding Remarks

This chapter attempted to combine classical information regarding the eggshell of insects with recent findings, embracing genetic, structural and physiological aspects. We hope to contribute with relevant information for those interested in insect eggs and eggshells, as other literature revisions have done in the past (Hinton 1981; Margaritis 1985a; Regier and Kafatos 1985; Trougakos and Margaritis 2002; Swevers et al. 2005). The increase in the number of insect species amenable to be used in the laboratory, as well as the advent of gene silencing and editing techniques allow us to predict that the genetic understanding regarding insect eggshells will flourish in the near future. In addition, the epigenetic regulation of eggshell formation is poorly understood and should also be aimed. It is of interest to understand the commonalities present throughout the insect taxa as well as the evolutionary processes related with specific taxon or species. How are specific (epi)genetic features related with the ecology of each egg? e.g., if the egg is parasitized by other insects or by microorganisms; if eggs are laid in litter, under bark, within animals or plants, in aquatic or semiaquatic habitats or other environments (Zeh et al. 1989). In addition only one species with panoistic ovaries has its (epi)genetic process of eggshell formation studied with some depth: the German cockroach *Blattella germanica* (Sects. 9.2.2.1, 9.2.6, 9.2.7). The eggs of this cockroach are encased within an ootheca that poses distinct challenges for the egg. How similar or different is the production of an egg originated from a panoistic ovary without ootheca?

This is the first time that blastodermal and serosal cuticle egg envelopes have been reviewed. While their genetics and physiology are reasonably well described in insects, nearly null information regarding these aspects exists in non-insect arthropods. In addition, to understand how the ancestral blastodermal cuticle originated the derived serosal cuticle (Sect. 9.3.3) is an interesting theme for the fields of developmental biology and evolution. This can be tackled employing species whose genes can be silenced or edited such as some spiders, crustaceans, collembolans, crickets, grasshoppers, moths and beetles.

Finally, one of the themes deserving attention is the genetics of production of lipids (or waxes) present in structures such as the chorion wax layer and the serosal epicuticle. The relevance of lipids or its derivatives for the production of water-proofing layers is well acknowledged (Hadley 1994; Chapman 1998) but there are few studies in insects showing the genetics behind it (Qiu et al. 2012) and none at the egg stage. Transcriptome analyses, such as the ones employed in *D. melanogaster* follicle cells (Tootle et al. 2011) and *An. gambiae* serosal cells (Goltsev et al. 2009), when properly followed by functional studies, might fill this gap.

## References

- Akey CW, Crepeau RH, Edelstein SJ (1987) The innermost chorionic layer of *Drosophila* II. Three-dimensional structure determination of the 90° crystal form by electron microscopy. *J Mol Biol* 193:685–692
- Amenya DA, Chou W, Li J, Yan G, Gershon PD, James AD, Marinotti O (2010) Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. *J Insect Physiol* 56:1414–1419
- Anderson DT (1973) Embryology and phylogeny in annelids and arthropods. Pergamon Press, Oxford
- Andrenacci D, Cernilogar FM, Taddei C, Rotoli D, Cavaliere V, Graziani F, Gargiulo G (2001) Specific domains drive VM32E protein distribution and integration in *Drosophila* eggshell layers. *J Cell Sci* 114:2819–2829
- Andrew RJ, Tembhare DB (1992) Surface ultrastructure of the egg chorion in the dragonfly, *Ictinogomphus rapax* (Rambur) (Odonata, Gomphidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 21:347–350
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ (2005) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11337–11342
- Badciong JC, Otto JM, Waring GL (2001) The functions of the multiproduct and rapidly evolving *dec-1* eggshell gene are conserved between evolutionarily distant species of *Drosophila*. *Genetics* 159:1089–1102
- Beament JWL (1949) The Penetration of Insect Egg-Shells. 2. The properties and permeability of sub-chorial membranes during development of *Rhodnius prolixus* Stål. *Bull Entomol Res* 9:467–488
- Beckel WE (1954) Studies the biology of the *Aedes* of northern Canada (Culicidae). I. Preliminary investigation of development in the egg. Defence research northern laboratory technical paper no. 6. Defence Research Board, Ottawa
- Beckel WE (1958) Investigation of permeability, diapause, and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Can J Zool* 36:541–554
- Belles X, Cassier P, Cerda X, Pascual N, Andre M, Rosso Y, Piulachs MD (1993) Induction of choriogenesis by 20-hydroxyecdysone in the German cockroach. *Tissue Cell* 25:195–204
- Budd GE, Telford MJ (2009) The origin and evolution of arthropods. *Nature* 457:812–817
- Burkhart CN, Arbogast J, Smythe P, Butkhart CG (1999) Histochemical analysis of the nit of *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol* 30:530–532
- Campbell FL (1929) The detection and estimation of insect chitin; and the irrelatation of “chitinization” to hardness and pigmentation of the cuticula of the American cockroach, *Periplaneta americana*. L. *Ann Entomol Soc Am* 22:401–426
- Cavaliere V, Bernardi F, Romani P, Duchi S, Gargiulo G (2008) Building up the *Drosophila* eggshell: first of all the eggshell genes must be transcribed. *Dev Dyn* 237:2061–2072
- Cernilogar FM, Fabbri F, Andrenacci D, Taddei C, Gargiulo G (2001) *Drosophila* vitelline membrane cross-linking requires the *fs(1)Nasrat*, *fs(1)polehole* and chorion genes activities. *Dev Genes Evol* 211:573–580
- Chapman RF (1998) The insects – structure and function, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Chapman RF (2013) The insects – structure and function, 5th edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Chasan R, Anderson KV (1993) Maternal control of dorsal-ventral polarity and pattern in the embryo. In: Bate M, Martinez-Arias A (eds) The development of *Drosophila melanogaster*, vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 387–424
- Chaudhari SS, Noh MY, Moussian B, Specht CA, Kramer KJ, Beeman RW, Arakane Y, Muthukrishnan S (2015) Knickkopf and retroactive proteins are required for formation of laminar serosal procuticle during embryonic development of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* 60:1–6

- Chauvin G, Barbier R (1979) Morphogenese de l'enveloppe vitelline, ultrastructure du chorion et de la cuticule serosale chez *Korscheltellus lupulinus* L. (Lepidoptera:Hepialidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 8:375–386
- Chauvin G, Hamon C, Vancassel M, Vannier G (1991) The eggs of *Forficula auricularia* L. (Dermaptera, Forficulidae): ultrastructure and resistance to low and high temperatures. *Can J Zool* 69:2873–2878
- Chen Z, Nohata J, Guo H, Li S, Liu J, Guo Y, Yamamoto K, Kadono-Okuda K, Liu C, Arunkumar KP, Nagaraju J, Zhang Y, Liu S, Labropoulou V, Swevers L, Tsitoura P, Iatrou K, Gopinathan KP, Goldsmith MR, Xia Q, Mita K (2015a) A comprehensive analysis of the chorion locus in silkworm. *Sci Rep* 5:16424
- Chen Z, Nohata J, Guo H, Li S, Liu J, Guo Y, Yamamoto K, Kadono-Okuda K, Liu C, Arunkumar KP, Nagaraju J, Zhang Y, Liu S, Labropoulou V, Swevers L, Tsitoura P, Iatrou K, Gopinathan KP, Goldsmith MR, Xia Q, Mita K (2015b) Construction, complete sequence, and annotation of a BAC contig covering the silkworm chorion locus. *Sci Data* 2:150062
- Christophers SR (1960) *Aedes aegypti* (L) the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, Cambridge
- Clements AN (1992) The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction, vol 1. Chapman and Hall, London
- Cummins SF, Nagle GT (2005) *Aplysia* capsulin is localized to egg capsules and egg cordon sheaths and shares sequence homology with *Drosophila dec-1* gene products. *Peptides* 26:589–596
- D'Alterio C, Tran DDD, Yeung MWYA, Hwang MS, Li MA, Arana CJ, Mulligan VK, Kubesh M, Sharma P, Chase M, Tepass U, Godt D (2005) *Drosophila melanogaster* Cad99C, the orthologue of human Usher cadherin CDH15, regulates the length of microvilli. *J Cell Biol* 171:549–558
- Dias FA, Gandara AC, Queiroz-Barros FG, Oliveira RL, Sorgine MH, Braz GR, Oliveira PL (2013) Ovarian dual oxidase (Duox) activity is essential for insect eggshell hardening and waterproofing. *J Biol Chem* 288:35058–35067
- Donoughe S, Extavour CG (2015) Embryonic development of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Biol*. doi:10.1016/j.ydbio.2015.04.009
- Dorn A (1976) Ultrastructure of embryonic envelopes and integument of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera).1. Chorion, amnion, serosa, integument. *Zoomorphologie* 85:111–131
- Edwards MJ, Severson DW, Hagedorn HH (1998) Vitelline envelope genes of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 28:915–925
- Elalayli M, Hall JD, Fakhouri M, Neiswender H, Ellison TT, Han Z, Roon P, LeMosy EK (2008) Palisade is required in the *Drosophila* ovary for assembly and function of the protective vitelline membrane. *Dev Biol* 319:359–369
- Elsy KD (1972) Defenses of eggs of *Manduca sexta* against predation by *Jalysus spinosus*. *Ann Entomol Soc Am* 65:896–897
- Fakhouri M, Elalayli M, Sherling D, Hall JD, Miller E, Sun X, Wells L, LeMosy EK (2006) Minor proteins and enzymes of the *Drosophila* eggshell matrix. *Dev Biol* 293:127–141
- Farnesi LC, Menna-Barreto RF, Martins AJ, Valle D, Rezende GL (2015) Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol* 83:43–52
- Fausto AM, Maroli M, Mazzini M (1992) Ootaxonomy and eggshell ultrastructure of *Phlebotomus* sandflies. *Med Vet Entomol* 6:201–208
- Ferdig MT, Li J, Severson DW, Christensen BM (1996) Mosquito dopa decarboxylase cDNA characterization and blood-meal-induced ovarian expression. *Insect Mol Biol* 5:119–126
- Fisher HL, Watson J (2015) A fossil insect egg on an early cretaceous conifer shoot from the Wealden of Germany. *Cretac Res* 53:38–47

- Fletcher GC, Lucas EP, Brain R, Tournier A, Thompson BJ (2012) Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize Crumbs in the *Drosophila* follicle cell epithelium. *Curr Biol* 22:1116–1122
- Fukui M, Machida R (2006) Embryonic development of *Baculentulus densus* (Imadaté): an outline (Hexapoda: Protura, Acerentomidae). *Proc Arthropod Embryol Soc Jpn* 41:21–28
- Furneaux PJ, Mcfarlane JE (1965a) Identification, estimation, and localization of catecholamines in eggs of the house cricket, *Acheta domesticus* L. *J Insect Physiol* 11:591–600
- Furneaux PJ, Mcfarlane JE (1965b) A possible relationship between the occurrence of catecholamines and water absorption in insect eggs. *J Insect Physiol* 11:631–635
- Furneaux PJ, James CR, Potter S (1969) The egg shell of the house cricket (*Acheta domesticus*): an electronmicroscope study. *J Cell Sci* 5:227–249
- Gautam SG, Opit GP, Margosan D, Hoffmann JS, Tebbets SW (2015) Comparative egg morphology and chorionic ultrastructure of key stored-product insect pests. *Ann Entomol Soc Am* 108:43–56
- Gilbert SF, Raunio AM (1997) *Embryology: constructing the organism*. Sinauer Associates, Sunderland
- Giribet G, Edgecombe GD (2012) Reevaluating the arthropod tree of life. *Annu Rev Entomol* 57:167–186
- Glowinski C, Liu RH, Chen X, Darabie A, Godt D (2014) Myosin VIIA regulates microvillus morphogenesis and interacts with cadherin Cad99C in *Drosophila* oogenesis. *J Cell Sci* 127:4821–4832
- Goforth CL, Smith RL (2011) Respiratory morphology of the *Abedus herberti* Hidalgo egg chorion (Hemiptera: Belostomatidae). *J Morphol* 272:796–801
- Goldsmith MR (1989) Organization and developmental timing of the *Bombyx mori* chorion gene clusters in strain C108. *Dev Genet* 10:16–23
- Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D, Levine M (2009) Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol* 330:462–470
- Guglielmino A, Taddei AR, Carcupino M (1997) Fine structure of the eggshell of *Ommatissus binotatus* Fieber (Homoptera, Auchenorrhyncha, Tropiduchidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 26:85–89
- Hadley NF (1994) *Water relations of terrestrial arthropods*. Academic Press, California, p 356
- Haga K (1985) Oogenesis and embryogenesis of the idiothripine thrips, *Bactrothrips brevitubus* (Thysanoptera, Phlaeothripidae). In: Ando H, Miya K (eds) *Recent advances in insect embryology in Japan*. ISEBU Co. Ltd., Tsukuba, pp 45–106
- Hamodrakas SJ, Margaritis LH, Nixon PE (1982) Crystalline layer in *Drosophila melanogaster* egg-shell: arrangement of components as revealed by negative staining and reconstruction. *Int J Biol Macromol* 4:25–31
- Han Q, Li G, Li J (2000a) Chorion peroxidase-mediated NADH/O<sub>2</sub> oxidoreduction cooperated by chorion malate dehydrogenase-catalyzed NADH production: a feasible pathway leading to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Biochim Biophys Acta* 1523:246–253
- Han Q, Li G, Li J (2000b) Purification and characterization of chorion peroxidase from *Aedes aegypti* eggs. *Arch Biochem Biophys* 378:107–115
- Hartley JC (1962) The egg of *Tetrix* (Tetrigidae, Orthoptera), with a discussion on the probable significance of the anterior horn. *Q J Microsc Sci* 103:253–259
- Harwood RF, Horsfall WR (1959) Development, structure, and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes. III. Functions of coverings. *Ann Entomol Soc Am* 52:113–116
- Hatzopoulos AK, Regier JC (1987) Evolutionary changes in the developmental expression of silkworm chorion genes and their morphological consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:479–483
- Hawley RJ, Waring GL (1988) Cloning and analysis of the *dec-1* female-sterile locus, a gene required for proper assembly of the *Drosophila* eggshell. *Genes Dev* 2:341–349

- Heifetz Y, Yu J, Wolfner MF (2001) Ovulation triggers activation of *Drosophila* oocytes. *Dev Biol* 234:416–424
- Heming BS (1979) Origin and fate of germ cells in male and female embryos of *Haplothrips verbasci* (Osborn) (Insecta, Thysanoptera, Phlaeothripidae). *J Morph* 160:323–344
- Herraiz A, Belles X, Piulachs MD (2014) Chorion formation in panoistic ovaries requires Wendei and trimethylation of histone 3 lysine 9. *Exp Cell Res* 220:46–53
- Hinton HE (1968) Structure and protective devices of the egg of the mosquito *Culex pipiens*. *J Insect Physiol* 14:145–161
- Hinton HE (1977) Function of shell structures of pig louse and how egg maintains a low equilibrium temperature in direct sunlight. *J Insect Physiol* 23:785–800
- Hinton HE (1981) *Biology of insect eggs*, vols I-III. Pergamon Press, Oxford
- Hopkins TL, Kramer KJ (1992) Insect cuticle sclerotization. *Annu Rev Entomol* 37:273–302
- Ikeda Y, Machida R (2001) Embryogenesis of the dipluran *Lepidocampa weberi* Oudemans (Hexapoda: Diplura, Campodeidae): formation of dorsal organ and related phenomena. *J Morphol* 249:242–251
- Irles P, Piulachs MD (2011) Citrus, a key insect eggshell protein. *Insect Biochem Mol Biol* 41:101–108
- Irles P, Bellés X, Piulachs MD (2009a) Identifying genes related to choriogenesis in insect panoistic ovaries by suppression subtractive hybridization. *BMC Genomics* 10:206
- Irles P, Bellés X, Piulachs MD (2009b) Brownie, a gene involved in building complex respiratory devices in insect eggshells. *PLoS One* 4(12):e8353
- Jacobs CG, Rezende GL, Lamers GE, van der Zee M (2013) The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc Biol Sci* 280:20131082
- Jacobs CG, Braak N, Lamers GE, van der Zee M (2015) Elucidation of the serosal cuticle machinery in the beetle *Tribolium* by RNA sequencing and functional analysis of Knickkopf1, Retroactive and Laccase2. *Insect Biochem Mol Biol* 60:7–12
- Jagadeeshan S, Singh RS (1997) Rapid evolution of outer egg membrane proteins in the *Drosophila melanogaster* subgroup: a case of ecologically driven evolution of female reproductive traits. *Mol Biol Evol* 24:929–938
- Jahn TL (1935) Nature and permeability of grasshopper egg membranes. II. Chemical composition of membranes. *Proc Soc Exp Biol Med* 33:159–163
- Jiménez G, González-Reyes A, Casanova J (2002) Cell surface proteins Nasrat and Polehole stabilize the Torso-like extracellular determinant in *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* 16:913–918
- Jintsu Y, Uchifune T, Machida R (2010) Structural features of eggs of the basal phasmatodean *Timema monikensis* Vickery & Sandoval, (Insecta: Phasmatodea: Timematidae). *Arthropod Syst Phylogeny* 68:71–78
- Jura C (1972) Development of apterygote insects. In: Counce SJ, Waddington CH (eds) *Developmental systems: insects*. Academic Press, London, pp 49–94
- Jura C, Krzysztofowicz A, Kisiel E (1987) Embryonic development of *Tetradontophora bielaniensis* (Collembola): descriptive, with scanning electron micrographs. In: Ando H, Jura C (eds) *Recent advances in insect embryology in Japan and Poland*. Arthropod Embryol Soc Jpn ISEBU Co. Ltd., Tsukuba
- Kafatos FC (1975) The insect chorion: programmed expression of specific genes. *Adv Exp Med Biol* 62:103–121
- Kafatos FC, Regier JC, Mazur GD, Nadel MR, Blau HM, Petri WH, Wyman AR, Gelinas RE, Moore PB, Paul M, Efstratiadis A, Vournakis JN, Goldsmith MR, Hunsley JR, Baker B, Nardi J, Koehler M (1977) The eggshell of insects: differentiation-specific proteins and the control of their synthesis and accumulation during development. *Results Probl Cell Differ* 8:45–145
- Kaya M, Sargin I, Tozak KÖ (2013) Chitin extraction and characterization from *Daphnia magna* resting eggs. *Int J Biol Macromol* 61:459–464
- Kendirgi F, Swevers L, Iatrou K (2002) An ovarian follicular epithelium protein of the silkworm (*Bombyx mori*) that associates with the vitelline membrane and contributes to the structural integrity of the follicle. *FEBS Lett* 524:59–68



- Keramaris KE, Stravopodis D, Margaritis LH (1991) A structural protein that plays an enzymatic role in the eggshell of *Drosophila melanogaster*. *Cell Biol Int Rep* 15:151–159
- Kershaw JC (1914) Development of an embiid. *J R Microsc Soc* 34:24–27
- Khayat M, Babin PJ, Funkenstein B, Sammar M, Nagasawa H, Tietz A, Lubzens E (2001) Molecular characterization and high expression during oocyte development of a shrimp ovarian cortical rod protein homologous to insect intestinal peritrophins. *Biol Reprod* 64:1090–1099
- Kim C, Han K, Kim J, Yi JS, Kim C, Yim J, Kim YJ, Kim-Ha J (2002) *Femcoat*, a novel eggshell protein in *Drosophila*: functional analysis by double stranded RNA interference. *Mech Dev* 110:61–70
- Kleve CD, Siler DA, Syed SK, Eldon ED (2006) Expression of *18-wheeler* in the follicle cell epithelium affects cell migration and egg morphology in *Drosophila*. *Dev Dyn* 235:1953–1961
- Kliewer JW (1961) Weight and hatchability of *Aedes aegypti* eggs. *Ann Entomol Soc Am* 54:912–917
- Klowden MJ (2007) *Physiological systems in insects*. Academic Press, Burlington
- Knoll HJ (1974) Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte von *Scutigera coleoptrata* L. (Chilopoda). *Zool Jb Anat* 92:47–132
- Kobayashi Y (1998) Embryogenesis of the fairy moth *Nemophora albiguttata* Issiki (Lepidoptera, Adelidae) with special emphasis on its phylogenetic implications. *Int J Insect Morphol Embryol* 27:157–166
- Konopová B, Zrzavý J (2005) Ultrastructure, development, and homology of insect embryonic cuticles. *J Morphol* 264:339–362
- Konstandi OA, Papassideri IS, Stravopodis DJ, Kenoutis CA, Hasan Z, Katsorchis T, Wever R, Margaritis LH (2005) The enzymatic component of *Drosophila melanogaster* chorion is the Pxd peroxidase. *Insect Biochem Mol Biol* 35:1043–1057
- Konstandi OA, Papassideri IS, Stravopodis DJ, Antonelou MH, Kenoutis CA, Stefanidou DC, Margaritis LH (2006) The dual role of chorion peroxidase in *Bactrocera oleae* chorion assembly. *Int J Dev Biol* 50:543–552
- Kubrakiewicz J, Jedrzejowka I, Szymańska B, Biliński SM (2005) Micropyle in neuropterid insects. Structure and late stages of morphogenesis. *Arthropod Struct Dev* 34:179–188
- Kučerová Z, Stejskal V (2008) Differences in egg morphology of the stored-grain pests *Rhyzopertha dominica* and *Prostephanus truncatus* (Coleoptera, Bostrichidae). *J Stored Prod Res* 44:103–105
- Kudo S-I, Nakahira T, Saito Y (2006) Morphology of trophic eggs and ovarian dynamics in the subsocial bug *Adomerus triguttulus* (Heteroptera, Cydnidae). *Can J Zool* 84:723–728
- Kumar V, Kamble CK (2008) Scanning electron microscope study on the egg chorion of silkworm, *Antheraea assamensis* Helf. (Lepidoptera, Saturniidae). *Anim Biol* 58:235–244
- Kumar V, Kariappa BK, Babu AM, Dandin SB (2007) Surface ultrastructure of the egg chorion of Eri silkworm, *Samia ricini* Donovan (Lepidoptera, Saturniidae). *J Entomol* 4:68–81
- Lagueux M, Hirn M, Hoffmann JA (1977) Ecdysone during ovarian development in *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* 23:109–119
- Lagueux M, Hetru C, Goltzene F, Kappler C, Hoffmann JA (1979) Ecdysone titre and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* 25:709–723
- Lamer A, Dorn A (2001) The serosa of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera): ontogeny, secretory activity, structural changes, and functional considerations. *Tissue Cell* 33:580–595
- Lecanidou R, Rodakis GC, Eickbush TH, Kafatos FC (1986) Evolution of the silk moth chorion gene superfamily: gene families CA and CB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6514–6518
- LeMosy EK, Hashimoto C (2000) The nudel protease of *Drosophila* is required for eggshell biogenesis in addition to embryonic patterning. *Dev Biol* 217:352–361
- Li J (1994) Egg chorion tanning in *Aedes aegypti* mosquito. *Comp Biochem Physiol* 109:835–843
- Li JS, Li J (2006) Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 6:954–964

- Li J, Hodgeman BA, Christensen BM (1996) Involvement of peroxidase in chorion hardening in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 26:309–317
- Li J, Kim SR, Li J (2004) Molecular characterization of a novel peroxidase involved in *Aedes aegypti* chorion protein crosslinking. *Insect Biochem Mol Biol* 34:1195–1203
- Lincoln DCR (1961) The oxygen and water requirements of the egg of *Ocypus olens* Muller (Staphylinidae, Coleoptera). *J Insect Physiol* 7:265–272
- Lounibos LP, Duzak D, Linley JR, Lourenço-de-Oliveira R (1997) Egg structures of *Anopheles fluminensis* and *Anopheles shannoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:221–232
- Luschnig S, Bätz T, Armbruster K, Krasnow MA (2006) Serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Curr Biol* 16:186–194
- Ma PWK, Baird S, Ramaswamy SB (2002) Morphology and formation of the eggshell in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera, Miridae). *Arthropod Struct Dev* 31:131–146
- Machida R (2006) Evidence from embryology for reconstructing the relationships of hexapod basal clades. *Arthropod Syst Phylogeny* 64:95–104
- Machida R, Ando H (1985) Blastodermic cuticles of the jumping bristletail, *Pedetontus unimaculatus* (Microcoryphia, Machilidae). In: Ando H, Miya K (eds) Recent advances in insect embryology in Japan. ISEBU Co. Ltd., Tsukuba, pp 131–137
- Machida R, Ando H (1998) Evolutionary changes in developmental potentials of the embryo proper and embryonic membranes along with the derivative structures in atelocerata, with special reference to hexapoda (Arthropoda). *Proc Arthropod Embryol Soc Jpn* 33:1–13
- Machida R, Nagashima T, Ando H (1994) Embryonic development of the jumping bristletail *Pedetontus unimaculatus* Machida, with special reference to embryonic membranes (Hexapoda: Microcoryphia, Machilidae). *J Morphol* 220:147–165
- Machida R, Ikeda Y, Tojo K (2002) Evolutionary changes in developmental potentials of the embryo proper and embryonic membranes in Hexapoda: a synthesis revised. *Proc Arthropod Embryol Soc Jpn* 37:1–11
- Manogaran A, Waring GL (2004) The N-terminal prodomain of sV23 is essential for the assembly of a functional vitelline membrane network in *Drosophila*. *Dev Biol* 270:261–271
- Marchiondo AA, Meola SM, Palma KG, Slusser JH, Meola RW (1999) Chorion formation and ultrastructure of the egg of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 36:149–157
- Margaritis LH (1985a) Structure and physiology of the eggshell. In: Kerkut GA, Gilbert LL (eds) Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol 1. Pergamon Press, Oxford, pp 153–230
- Margaritis LH (1985b) The egg-shell of *Drosophila melanogaster* III. Covalent crosslinking of the chorion proteins involves endogenous hydrogen peroxide. *Tissue Cell* 17:553–559
- Margaritis LH (1986) The eggshell of *Drosophila melanogaster*. II. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis. *Can J Zool* 64:2152–2175
- Margaritis LH, Keramaris KE (1991) Immunolocalization of a peroxidase in the eggshell of *D. melanogaster*: evidence for its participation in the hardening process. *Micron Microsc Acta* 22:247–248
- Margaritis LH, Petri WH, Wyman AR (1979) Structural and image analysis of a crystalline layer from the dipteran egg-shell. *Cell Biol Int Rep* 3:61–66
- Margaritis LH, Kafatos FC, Petri WH (1980) The eggshell of *Drosophila melanogaster*. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. *J Cell Sci* 43:1–35
- Margaritis LH, Dellas K, Kalantzi MCh, Kambysellis MP (1983) The eggshell of Hawaiian *Drosophila*: structure and biochemical studies in *D. grimshawi* and comparison to *D. melanogaster*. *Roux Arch Dev Biol* 192:303–316
- Margaritis LH, Hamodrakas SJ, Papassideri I, Arad T, Leonard KR (1991) Three-dimensional reconstruction of innermost chorion layer of *Drosophila grimshawi* and *Drosophila melanogaster* eggshell mutant *fs(1)384*. *Int J Biol Macromol* 191:247–253

- Marinotti O, Ngo T, Kojin BB, Chou SP, Nguyen B, Juhn J, Carballar-Lejarazú R, Marinotti PN, Jiang X, Walter MF, Tu Z, Gershon PD, James AA (2014) Integrated proteomic and transcriptomic analysis of the *Aedes aegypti* eggshell. *BMC Dev Biol* 14:15
- Mashimo Y, Beutel RG, Dallai R, Lee CY, Machida R (2014) Embryonic development of Zoraptera with special reference to external morphology, and its phylogenetic implications (Insecta). *J Morphol* 275:295–312
- Masumoto M, Machida R (2006) Development of embryonic membranes in the silverfish *Lepisma saccharina* Linnaeus (insecta: Zygentoma, Lepismatidae). *Tissue Cell* 38:159–169
- Mathew G, Rai KS (1975) Structure and formation of egg membranes in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 4:369–380
- Mauzy-Melitz D, Waring GL (2003) fc177, a minor dec-1 proprotein, is necessary to prevent ectopic aggregation of the endochorion during eggshell assembly in *Drosophila*. *Dev Biol* 255:193–205
- Mazzini M, Carcupino M, Santini L (1992) Eggshell fine structure of fungus-gnats *Neoempheria lineola* (Meig.) and *N. striata* (Meig.) (Diptera mycetophilidae, Mycomyinae). *Redia, LXXV*, 179–188
- McFarlane JE (1960) Structure and function of the egg shell as related to water absorption by the eggs of *Acheta domesticus* (L.). *Can J Zool* 38:231–241
- McFarlane JE (1962) The cuticles of the egg of the house cricket. *Can J Zool* 40:13–21
- McFarlane JE, Kennard CP (1960) Further observations on water absorption by the eggs of *Acheta domesticus* (L.). *Can J Zool* 38:77–85
- Medeiros MN, Logullo R, Ramos IB (2011) Transcriptome and gene expression profile of ovarian follicle tissue of the triatomine bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 41:823–831
- Miller A (1939) The egg and early development of the stonefly, *Pteronarcys proteus* Newman (Plecoptera). *J Morphol* 64:555–609
- Miller A (1940) Embryonic membranes, yolk cells, and morphogenesis of the stonefly *Pteronarcys proteus* Newman (Plecoptera: Pteronarcidae). *Ann Entomol Soc Am* 33:437–477
- Mindrinos MN, Petri WH, Galanopoulos VK, Lombard MF, Margaritis LH (1980) Crosslinking of the *Drosophila* chorion involves a peroxidase. *Roux Arch Dev Biol* 189:187–196
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer AJ, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley TR, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermiin LS, Kawahara AY, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Y, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia JL, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Pohl H, von Reumont BM, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich NU, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz MG, Wiegmann BM, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong TK, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates DK, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Y, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Y, Xu X, Zhang Y, Yang H, Wang J, Wang J, Kjer KM, Zhou X (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346:763–767
- Miura T, Braendle C, Shingleton A, Sisk G, Kambhampati S, Stern DL (2003) A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *J Exp Zool Part B* 295:59–81
- Monnerat AT, Soares MJ, Lima JBP, Rosa-Freitas MG, Valle D (1999) *Anopheles albitarsis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol* 45:915–922
- Moreira MF, Dos Santos AS, Marotta HR (2007) A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochem Mol Biol* 37:1249–1261
- Moussian B, Schwarz H, Bartoszewski S, Nüsslein-Volhard C (2005a) Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 264:117–130
- Moussian B, Söding J, Schwarz H, Nüsslein-Volhard C (2005b) Retroactive, a membrane-anchored extracellular protein related to vertebrate snake neurotoxin-like proteins, is required for cuticle organization in the larva of *Drosophila melanogaster*. *Dev Dyn* 233:1056–1063

- Moussian B, Tång E, Tonning A, Helms S, Schwarz H, Nüsslein-Volhard C, Uv AE (2006) *Drosophila* Knickkopf and retroactive are needed for epithelial tube growth and cuticle differentiation through their specific requirement for chitin filament organization. *Development* 133:163–171
- Mouzaki DG, Margaritis LH (1991a) Choriogenesis in the medfly *Ceratitis capitata* (Wiedermann) (Diptera: Tephritidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 20:51–68
- Mouzaki DG, Margaritis LH (1991b) The eggshell of the cherry fly *Rhagoletis cerasi*. *Tissue Cell* 23:745–754
- Mouzaki DG, Margaritis LH (1994) The eggshell of the almond wasp *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera, Eurytomidae) – 1. Morphogenesis and fine structure of the eggshell layers. *Tissue Cell* 26:559–568
- Mouzaki DG, Zarani FE, Margaritis LH (1991) Structure and morphogenesis of the eggshell and micropylar apparatus in the olive fly, *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *J Morphol* 209:39–52
- Nelson DR, Leopold RA (2003) Composition of the surface hydrocarbons from the vitelline membranes of dipteran embryos. *Comp Biochem Physiol* 136:295–308
- Nenon JP, Boivin G, Allo MR (1995) Fine-structure of the egg envelopes in *Listronotus oregonensis* (Leconte) (Coleoptera, Curculionidae) and morphological adaptations to oviposition sites. *Int J Insect Morphol Embryol* 24:333–342
- Noguerón MI, Waring GL (1995) Regulated processing of dec-1 eggshell proteins in *Drosophila*. *Dev Biol* 172:272–279
- Noguerón MI, Mauzy-Melitz D, Waring GL (2000) *Drosophila* dec-1 eggshell proteins are differentially distributed via a multistep extracellular processing and localization pathway. *Dev Biol* 225:459–470
- Orfanidou CC, Hamodrakas SJ, Margaritis LH, Galanopoulos K, Dedieu JC, Gulik-Krzywicki T (1992) Fine structure of the chorion of *Manduca sexta* and *Sesamia nonagrioides* as revealed by scanning electron microscopy and freeze-fracturing. *Tissue Cell* 24:735–744
- Osawa N, Yoshinaga A (2009) The presence of micropyles in the shells of developing and undeveloped eggs of the ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur J Entomol* 106:607–610
- Osterfield M, Du XX, Schüpbach T, Wieschaus E, Shvartsman SY (2013) Three-dimensional morphogenesis in the developing *Drosophila* egg. *Dev Cell* 24:400–410
- Pan C, Zhou Y, Mo J (2009) The clone of laccase gene and its potential function in cuticular penetration resistance of *Culex pipiens pallens* to fenvalerate. *Pestic Biochem Physiol* 93:105–111
- Panfilio KA (2008) Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev Biol* 313:471–491
- Papantonis A, Sourmeli S, Lecanidou R (2008) Chorion gene activation and repression is dependent on BmC/EBP expression and binding to cognate cis-elements. *Biochem Biophys Res Commun* 369:905–909
- Papantonis A, Swevers L, Iatrou K (2015) Chorion genes: a landscape of their evolution, structure, and regulation. *Annu Rev Entomol* 60:177–194
- Papassideri IS, Margaritis L (1986) Specific secretion of wax by the follicular cells of *Drosophila melanogaster*. *Cell Biol Int Rep* 10:963–968
- Papassideri IS, Margaritis LH (1996) The eggshell of *Drosophila melanogaster*: IX. Synthesis and morphogenesis of the innermost chorionic layer. *Tissue Cell* 28:401–409
- Papassideri IS, Margaritis LH, Gulik-Krzywicki T (1991) The egg-shell of *Drosophila melanogaster* VI, structural analysis of the wax layer in laid eggs. *Tissue Cell* 23:567–575
- Papassideri IS, Margaritis LH, Gulik-Krzywicki T (1993) The eggshell of *Drosophila melanogaster*. VIII. Morphogenesis of the wax layer during oogenesis. *Tissue Cell* 25:929–936
- Parks S, Spradling A (1987) Spatially regulated expression of chorion genes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* 1:497–509

- Pascucci T, Perrino J, Mahowald AP, Waring GL (1996) Eggshell assembly in *Drosophila*: processing and localization of vitelline membrane and chorion proteins. *Dev Biol* 177:590–598
- Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, Le Goff G, Young S, Wajnberg E, Fricaux T, Taquet N, Blomquist GJ, Feyereisen R (2012) An insect-specific P450 oxidative decarboxylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:14858–14863
- Rafiqi AM, Lemke S, Ferguson S, Stauber M, Schmidt-Ott U (2008) Evolutionary origin of the amnioserosa in cyclorrhaphan flies correlates with spatial and temporal expression changes of zen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:234–239
- Raikhel AS, Lea AO (1991) Control of follicular epithelium development and vitelline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. *Tissue Cell* 23:577–591
- Ramaswamy SB, Mbata GN, Cohen NE (1990) Necessity of juvenile-hormone for choriogenesis in the moth, *Heliothis virescens* (Noctuidae). *Invertebr Reprod Dev* 17:57–63
- Regier JC, Kafatos FC (1985) Molecular aspects of chorion formation. In: Kerkut GA, Gilber LI (eds) *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, pp 113–151
- Regier JC, Wong JR (1988) Assembly of silkmoth chorion proteins: *In vivo* patterns of disulfide bond formation. *Insect Biochem* 18:471–482
- Regier JC, Paukstadt U, Paukstadt LH, Mitter C, Peigler RS (2005) Phylogenetic of eggshell morphogenesis in *Antheraea* (Lepidoptera: Saturniidae): unique origin and repeated reduction of aeropyle crown. *Syst Biol* 54:254–267
- Regier JC, Shultz JW, Zwick A, Hussey A, Ball B, Wetzer R, Martin JW, Cunningham CW (2010) Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* 463:1079–1083
- Renthlei CZ, Raghavarman A, Kharbuli B, Dey S (2010) Progressive chorion morphology during egg development in *Samia ricini* (Donovan). *Microsc Res Tech* 73:234–239
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, Valle D (2008) Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol* 8:82
- Sarashina I, Mito T, Saito M, Uneme H, Miyawaki K, Shinmyo Y, Ohuchi H, Noji S (2005) Location of micropyles and early embryonic development of the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus* (Insecta, Orthoptera). *Dev Growth Differ* 47:99–108
- Savant SS, Waring GL (1989) Molecular analysis and rescue of a vitelline membrane mutant in *Drosophila*. *Dev Biol* 135:43–52
- Scherer LJ, Harris DH, Petri WH (1988) *Drosophila* vitelline membrane genes contain a 114 base pair region of highly conserved coding sequence. *Dev Biol* 130:786–788
- Schlaeger DA, Fuchs MS (1974) Effect of dopa-decarboxylase inhibition on *Aedes aegypti* eggs: evidence for sclerotization. *J Insect Physiol* 20:349–357
- Schlichting K, Wilsch-Brauninger M, Demontis F, Dahmann C (2006) Cadherin Cad99C is required for normal microvilli morphology in *Drosophila* follicle cells. *J Cell Sci* 119:1184–1195
- Schmidt-Ott U (2000) The amnioserosa is an apomorphic character of cyclorrhaphan flies. *Dev Genes Evol* 210:373–376
- Sdralia N, Swevers L, Iatrou K (2012) BmVMP90, a large vitelline membrane protein of the domesticated silkmoth *Bombyx mori*, is an essential component of the developing ovarian follicle. *Insect Biochem Mol Biol* 42:717–727
- Sekiguchi K (1960) Embryonic development of the horse-shoe crab studied by vital staining. *Bull Mari Sta Asamushi, Tohoku Univ* 10:161–164
- Sherrard KM, Fehon RG (2015) The transmembrane protein Crumbs displays complex dynamics during follicular morphogenesis and is regulated competitively by Moesin and aPKC. *Development* 142:1869–1878
- Slifer EH (1937) The origin and fate of the membranes surrounding the grasshopper egg, together with some experiments on the source of the hatching enzyme. *Q J Microsc Sci* 79:493–509

- Slifer EH, Sekhon SS (1963) The fine structure of the membranes which cover the egg of the grasshopper, *Melanoplus differentialis*, with special reference to the hydropyle. *Q J Microsc Sci* 104:321–334
- Sourmeli S, Papantonis A, Lecanidou R (2005) A novel role for the *Bombyx* Slbo homologue, BmC/EBP, in insect choriogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 337:713–719
- Souza-Ferreira PS, Mansur JF, Berni M, Moreira MF, dos Santos RE, Araújo HM, de Souza W, Ramos IB, Masuda H (2014) Chitin deposition on the embryonic cuticle of *Rhodnius prolixus*: the reduction of CHS transcripts by CHS-dsRNA injection in females affects chitin deposition and eclosion of the first instar nymph. *Insect Biochem Mol Biol* 51:101–109
- Spoerel NA, Nguyen HT, Eickbush TH, Kafatos FC (1989) Gene evolution and regulation in the chorion complex of *Bombyx mori*: hybridization and sequence analysis of multiple developmentally middle A/B chorion gene pairs. *J Mol Biol* 209:1–19
- Stein DS, Stevens LM (2014) Maternal control of the *Drosophila* dorsal-ventral body axis. *WIREs Dev Biol* 3:301–330
- Stender-Seidel S, Thomas G (1997) Investigation of different ontogenetic stages of *Raillietiella* sp. (Pentastomida:Cephalobaenida): the embryonic gland – glandula embryonalis – or dorsalar-gan. *Parasitol Res* 83:157–162
- Stevens LM, Beuchle D, Jurcsak J (2003) The *Drosophila* embryonic patterning determinant torso-like is a component of the eggshell. *Curr Biol* 13:1058–1063
- Striebel H (1960) Zur Embryonalentwicklung der Termiten. *Acta Trop* 1:193–260
- Sukontason K, Sukontason KL, Boonchu N, Chaiwong T, Piangjai S (2004) Ultrastructure of eggshell of *Chrysomya nigripes* Aubertin (Diptera: Calliphoridae). *Parasitol Res* 93:151–154
- Sukontason KL, Bunchu N, Chaiwong T, Kuntalue B, Sukontason K (2007) Fine structure of the eggshell of the blow fly, *Lucilia cuprina*. *J Insect Sci* 7:1–9
- Swevers BL, Raikhel AS, Sappington TW, Shirk P, Iatrou K (2005) Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds) *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier, Boston, pp 87–155
- Tiegs OW (1940) The embryology and affinities of the symphylas based on a study of *Hanseniella agilis*. *Q J Microsc Sci* 82:1–225
- Tiegs OW (1942) The ‘dorsal organ’ of the embryo of *Campodea*. *Q J Microsc Sci* 84:35–48
- Tiegs OW (1947) The development and affinities of the Pauropoda, based on a study of *Pauropus sylvaticus*. *Q J Microsc Sci* 88:165–271
- Tojo K, Machida R (1997) Embryogenesis of the mayfly *Ephemera japonica* McLachlan (Insecta:Ephemeroptera, Ephemeridae), with special reference to abdominal formation. *J Morphol* 234:97–107
- Tootle TL, Williams D, Hubb A (2011) *Drosophila* eggshell production: identification of new genes and coordination by Pxt. *PLoS One* 6:e19943
- Trougakos IP, Margaritis LH (1998a) The formation of the functional chorion structure of *Drosophila virilis* involves interaction of the “middle” and “late” major chorion proteins into scaffold formed by the “early” chorion proteins: a general model for chorion assembly in Drosophilidae. *J Struct Biol* 123:97–110
- Trougakos IP, Margaritis LH (1998b) Immunolocalization of the temporally “early” secreted major structural chorion proteins, Dvs38 and Dvs36, in the eggshell layers and regions of *Drosophila virilis*. *J Struct Biol* 123:111–123
- Trougakos IP, Margaritis LH (2002) Novel morphological and physiological aspects of insect eggs. In: Hilker M, Meiners T (eds) *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, pp 3–36
- Turner FR, Mahowald AP (1976) Scanning electron microscopy of *Drosophila* embryogenesis. 1. The structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm. *Dev Biol* 50:95–108
- Uchifune T, Machida R (2005) Embryonic development of *Galloisiana yuasai* Asahina, with special reference to external morphology (Insecta: Grylloblattodea). *J Morphol* 266:182–207
- Uemiyama H, Ando H (1987) Blastodermic cuticles of a springtail, *Tomocerus ishibashii* Yosii (Collembola, Tomoceridae). *Int J Insect Morphol Embryol* 16:5–6

- Valencia MD, Miller LH, Mazur P (1996) Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila*. *Cryobiology* 33:142–148
- van der Zee M, Berns N, Roth S (2005) Distinct functions of the *Tribolium* *zerknüllt* genes in serosa specification and dorsal closure. *Curr Biol* 15:624–636
- Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL (2014) Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol* 62:54–60
- Vasireddy V, Uchida Y, Salem N Jr, Kim SY, Mandal MN, Reddy GB, Bodepudi R, Alderson NL, Brown JC, Hama H, Dlugosz A, Elias PM, Holleran WM, Ayyagari R (2007) Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ( $\geq$  C28) and the unique omega-O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum Mol Genet* 16:471–482
- Ventura G, Furriols M, Martín N, Barbosa V, Casanova J (2010) *closca*, a new gene required for both Torso RTK activation and vitelline membrane integrity. Germline proteins contribute to *Drosophila* eggshell composition. *Dev Biol* 334:224–232
- Vogelgesang M, Szklarzewicz T (2001) Formation and structure of egg capsules in scale insects (Hemiptera, Coccidae) I, Ortheziidae. *Arthropod Struct Dev* 30:63–68
- Waring GL (2000) Morphogenesis of the eggshell in *Drosophila*. *Int Rev Cytol* 198:67–108
- Waring GL, Hawley RJ, Schoenfeld T (1990) Multiple proteins are produced from the *dec-1* eggshell gene in *Drosophila* by alternative RNA splicing and proteolytic cleavage events. *Dev Biol* 142:1–12
- Wigglesworth VB (1972) *The principles of insect physiology*. Chapman and Hall Limited, Cambridge
- Woods AH, Bonnacaze RY, Zrubek B (2005) Oxygen and water flux across eggshells of *Manduca sexta*. *J Exp Biol* 208:1297–1308
- Wu T, Manogaran AL, Beauchamp JM, Waring GL (2010) *Drosophila* vitelline membrane assembly: a critical role for an evolutionarily conserved cysteine in the “VM domain” of sV23. *Dev Biol* 347:360–368
- Wu X, Zhan X, Gan M, Zhang D, Zhang M, Zheng X, Wu Y, Li Z, He A (2013) Laccase2 is required for sclerotization and pigmentation of *Aedes albopictus* eggshell. *Parasitol Res* 112:1929–1934
- Xu Y, Fu Q, Li S, He N (2011) Silkworm egg proteins at the germ-band formation stage and a functional analysis of BmEP80 protein. *Insect Biochem Mol Biol* 41:572–581
- Zarani FE, Margaritis LH (1991) Ultrastructural features and formation of the micropylar apparatus in the cherry fly *Rhagoletis cerasi*. *J Morphol* 208:205–214
- Zarani FE, Margaritis LH (1994) The eggshell of the almond wasp *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera, Eurytomidae) -2. The micropylar appendage. *Tissue Cell* 26:569–577
- Zawadzka M, Jankowska W, Biliński SM (1997) Egg shell of mallophagans and anoplurans (Insecta: Phthiraptera): morphogenesis of specialized regions and the relation to F-actin cytoskeleton of follicular cells. *Tissue Cell* 29:665–673
- Zeh DW, Zeh JA, Smith RL (1989) Ovipositors, amnions and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. *Q Rev Biol* 64:147–168
- Zhang Z, Stevens LM, Stein D (2009) Sulfation of eggshell components by Pipe defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 19:1200–1205

## ANEXO II

Farnesi, L.C., **Vargas, H.C.M.**, Valle, D., Rezende, G.L., 2017. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, e0006063. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063>.



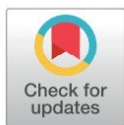
RESEARCH ARTICLE

# Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors

Luana C. Farnesi<sup>1</sup>, Helena C. M. Vargas<sup>2</sup>, Denise Valle<sup>3,4\*</sup>, Gustavo L. Rezende<sup>2,4\*</sup>

**1** Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, **3** Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **4** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\* [dvalle@ioc.fiocruz.br](mailto:dvalle@ioc.fiocruz.br) (DV); [guslrezende@gmail.com](mailto:guslrezende@gmail.com) (GLR)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Farnesi LC, Vargas HCM, Valle D, Rezende GL (2017) Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. PLoS Negl Trop Dis 11(10): e0006063. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063>

**Editor:** Pedro L. Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BRAZIL

**Received:** August 9, 2017

**Accepted:** October 22, 2017

**Published:** October 30, 2017

**Copyright:** © 2017 Farnesi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro ([www.faperj.br](http://www.faperj.br)), grants E-26/170.025/2008 and E-26/101.531/2010 to DV, E-26/111.978/2012 and E-26/111.238/2014 to GLR, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil ([www.cnpq.br](http://www.cnpq.br)), grant 573959/2008-0 to DV. LCF and HCMV were

## Abstract

Mosquito vectors lay their white eggs in the aquatic milieu. During early embryogenesis water passes freely through the transparent eggshell, which at this moment is composed of exochorion and endochorion. Within two hours the endochorion darkens via melanization but even so eggs shrink and perish if removed from moisture. However, during mid-embryogenesis, cells of the extraembryonic serosa secrete the serosal cuticle, localized right below the endochorion, becoming the third and innermost eggshell layer. Serosal cuticle formation greatly reduces water flow and allows egg survival outside the water. The degree of egg resistance to desiccation (ERD) at late embryogenesis varies among different species: *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus* eggs can survive in a dry environment for  $\geq 72$ , 24 and 5 hours, respectively. In some adult insects, darker-body individuals show greater resistance to desiccation than lighter ones. We asked if egg melanization enhances mosquito serosal cuticle-dependent ERD. Species with higher ERD at late embryogenesis exhibit more melanized eggshells. The melanization-ERD hypothesis was confirmed employing two *Anopheles quadrimaculatus* strains, the wild type and the mutant GORO, with a dark-brown and a golden eggshell, respectively. In all cases, serosal cuticle formation is fundamental for the establishment of an efficient ERD but egg viability outside the water is much higher in mosquitoes with darker eggshells than in those with lighter ones. The finding that pigmentation influences egg water balance is relevant to understand the evolutionary history of insect egg coloration. Since eggshell and adult cuticle pigmentation ensure insect survivorship in some cases, they should be considered regarding species fitness and novel approaches for vector or pest insects control.

fellows from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

## Author summary

Mosquitoes transmit various causative agents of diseases and the blockage of vector life cycle is an effective way to hamper disease transmission. The egg is the least known life stage and understanding it can contribute with novel strategies for mosquito control. Mosquitoes lay eggs in water collections, some of which are temporary. At early embryogenesis eggs are prone to lose water, leading to dehydration and death. During embryogenesis the serosal cuticle is produced, it wraps the embryo and contributes to the egg protection, allowing it to survive outside the water. Curiously, this resistance varies among mosquitoes: *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* eggs can survive outside the water for long, intermediate and short periods, respectively. Here, we show that these differences are related to the degree of eggshell melanization (melanin is a dark pigment): darker eggs resist more against water loss. We confirmed that melanin increases survival outside the water employing a mosquito mutant that does not melanize properly. The protection conferred by melanin is dependent on the formation of the serosal cuticle. Our results contribute to the study of the evolution of egg coloration in insects and we identified one of the reasons why *Aedes aegypti* eggs survive for several months outside water.

## Introduction

Mosquitoes of the genera *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* transmit pathogens that are the causative agents of diverse diseases such as yellow fever, dengue, chikungunya, Zika and West Nile viruses, malaria and lymphatic filariasis [1–7]. Blocking mosquito life cycle is an effective way to hamper disease transmission [8].

Mosquitoes lay their eggs in water pools, some of which are temporary [2]. Water passes freely through their eggshells during early embryogenesis and drying these water collections leads to egg desiccation, preventing its development. At this stage mosquito eggshell is composed of a brittle exochorion and a smooth transparent endochorion [2,9]. Laid eggs are white and their endochorion darkens less than three hours after being laid [1,2], (Fig 1A) due to the process that produces eumelanin, a brown to black pigment [10]. Throughout this work the eumelanin will be simply named "melanin".

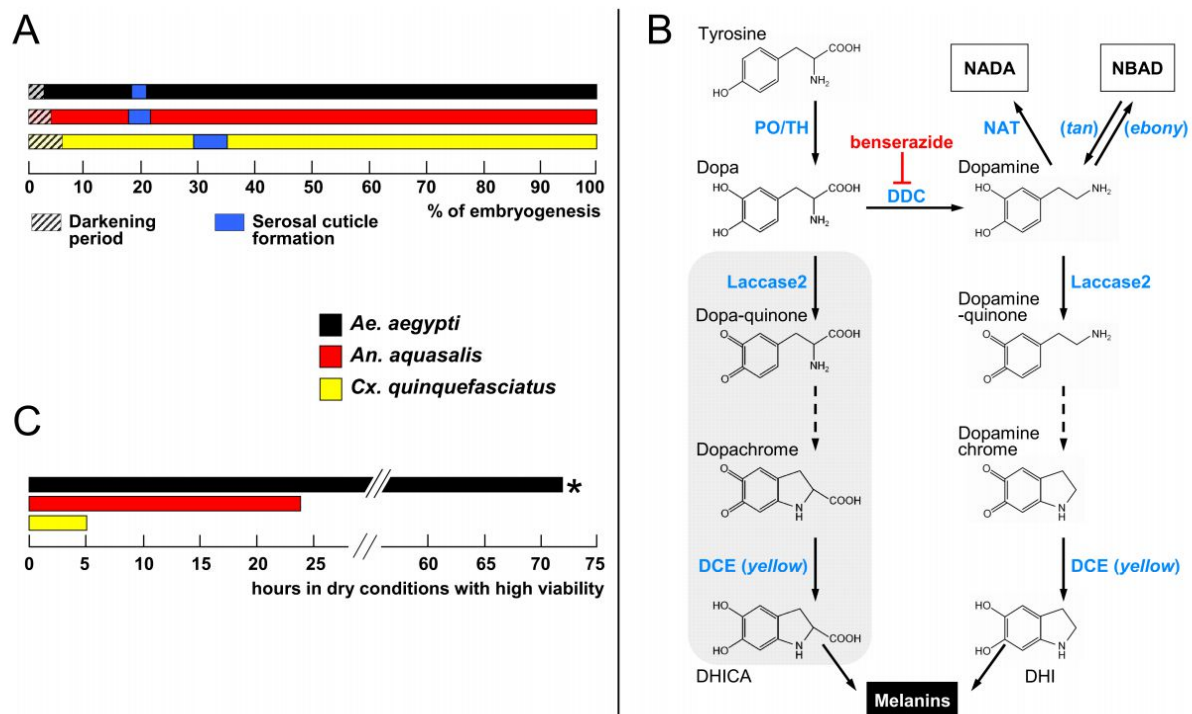
Melanization commences with L-tyrosine hydroxylation driven by phenoloxidase or tyrosine hydroxylase (Fig 1B). The resulting dopa is decarboxylated via dopa decarboxylase (DDC) giving rise to dopamine. Laccase 2 acts upon both dopa or dopamine oxidizing them and forming quinones that are further cyclized non-enzymatically originating dopachrome or dopaminechrome. These two molecules are substrates for dopachrome conversion enzyme (DCE, also known as *yellow* in *Drosophila melanogaster*) originating DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid) and DHI (5,6-dihydroxyindole) that are further employed in the synthesis of the polymeric melanin. Since dopa is an inadequate substrate for Laccase2 its contribution for melanin formation is minor. Dopamine can also be  $\beta$ -alanylated or acetylated, originating NBAD (N- $\beta$ -alanyldopamine) or NADA (N-acetyldopamine) that are further transformed into quinones that participate in sclerotization (Fig 1B) [11–16].

However, even melanized *Aedes* eggs shrink and die in a few hours if removed from a moist environment [16,17]. On the other hand, between 17 and 35 percent of embryogenesis (this percentage varies among species), the serosa, an extraembryonic membrane, secretes the serosal cuticle (Fig 1A). The serosal cuticle is an extracellular matrix; located below the endochorion, becomes the third and innermost eggshell layer. Its formation considerably reduces

water passage through the eggshell, preventing eggs to shrink due to desiccation and prompting eggs to maintain their viability outside the water [17,18].

Curiously, the level of egg resistance to desiccation (ERD) varies among mosquito species at the end of embryogenesis: while *Aedes aegypti* eggs can survive for at least 72 hours in a dry environment (high ERD), those of *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus* under the same condition can survive, respectively, for 24 hours (medium ERD) and 5 hours (low ERD) (Fig 1C) [19]. Physical and biochemical features of these eggs were investigated in order to identify traits associated with these differences. Chitin content is directly related to ERD levels while both egg volume increase during embryogenesis and eggshell superficial density are inversely related to it. Moreover, other yet unidentified traits might also be relevant [20].

Although melanization increases the desiccation resistance of adult insects of different orders [22–25] it is currently unknown if the same process occurs in insect eggs. We investigated here if the intensity of eggshell pigmentation is associated with the levels of desiccation resistance in mosquito vector eggs.



**Fig 1. Events related to mosquito embryogenesis.** (A) Periods of egg darkening and serosal cuticle formation. Data are shown as percentages of the total embryonic development for each species, which is 77.4, 51.3 and 34.2 hours after egg laying for *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*, respectively. (B) Melanization pathway. Chromes are formed non-enzymatically (dashed arrows). DHICA: 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHI: 5,6-dihydroxyindole. NADA (N-acetyldopamine) and NBAD (N-β-alanyldopamine) are also substrates for Laccase 2, originating quinones that participate in the sclerotization pathway. Grey background: Dopa contribution for melanin formation is minor since it is a poor substrate for Laccase2 (see main text). Enzyme names are shown in blue and *Drosophila melanogaster* mutants, in italic. PO: phenoloxidase, TH: tyrosine hydroxylase, DCE: dopachrome conversion enzyme, DDC: dopa decarboxylase, NAT: N-acetyltransferase, *tan*: N-β-alanyldopamine hydrolase, *ebony*: N-β-alanyldopamine synthase. Red inhibition symbol: the drug benserazide inhibits DDC activity. (C) Egg resistance to desiccation at the end of embryogenesis. At 80% of total embryogenesis, eggs were transferred from water to dry conditions (20–55% relative humidity), and their viability monitored at regular intervals. \* *Ae. aegypti* eggs are viable outside water for even longer periods, up to several months [1,17,21]. All data in A and C were recovered from Vargas *et al.* [19], except darkening period obtained from Christophers [1] and Clements [2].

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063.g001>

## Methods

### Mosquito sources and rearing

Experiments were conducted with *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932) and *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) continuously maintained at the Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The strains ORLANDO and GORO of *Anopheles quadrimaculatus* (Say, 1824) were reared between March and August 2013 at the Florida Medical Entomology Laboratory (FMEL), Florida University, Vero Beach, FL, USA. Both *An. quadrimaculatus* strains, ORLANDO (MRA-139) (<https://www.beiresources.org/Catalog/BEIVectors/MRA-139.aspx> - accessed 15 February 2016) and GORO (MRA-891) (<https://www.beiresources.org/Catalog/BEIVectors/MRA-891.aspx> - accessed 15 February 2017) were obtained through the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4) (Manassas, VA, USA), as part of the Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository (BEI Resources), NIAID, NIH and were deposited by MQ Benedict. The *An. quadrimaculatus* ORLANDO strain is mentioned in this work as "WT" (i.e. wild type). The *An. quadrimaculatus* GORO strain contains two independent EMS-induced mutations, both on the X chromosome, and was generated by crossing the GOCUT strain (MRA-123, containing the *golden cuticle* phenotype) and the ROSEYE strain (MRA-122, containing the *rose eye* color phenotype); hence the name GORO: Golden cuticle + ROse eyes. GORO genotype is  $go^1 pk^1 + ro^1$  and its phenotype is golden cuticle at all stages and rose eye from larvae on (see also the [Results](#) section). The *Anopheles gambiae* mosquitoes, obtained weekly from LPD, NIAID, NIH, were employed on August 2000 at the Laboratory of Fundamental and Applied Cryobiology, University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.

Larvae were reared at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  in rectangular plastic basins (*Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*) or rectangular iron pans coated with vitreous enamel (*An. quadrimaculatus*) containing 300 specimens within 1 liter of water and with 1 gram of food being provided every two days. Water and diet source varied according to the mosquito species: dechlorinated water and cat food Friskies ("Peixes-Sensações marinhas", Purina, Camaquã, RS, Brazil) for *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, brackish dechlorinated water (2 mg of marine salt/mL of dechlorinated water) and fish food Tetramin (*Tetramarine Saltwater Granules*, Tetra GmbH, Germany) for *An. aquasalis*, tap water and brewer's yeast/liver powder (1:1) for *An. quadrimaculatus*. In all cases, adults were kept at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12/12 h light/dark cycle, 70–80% relative humidity and fed *ad libitum* with 10% sucrose solution, except when prepared for blood feeding (see below).

### Synchronous egg laying

The synchronous egg laying method was adapted from Valencia *et al.* [26,27], as previously described [17,19,20]. For egg production, females of all species, three to seven days old, were sugar deprived for 24 hours and then blood-fed on anaesthetized chickens (*An. quadrimaculatus*) or guinea pigs (all other species). Immediately before egg laying induction, females were transferred to 15 mL centrifuge tubes and anesthetized in ice for a few minutes. The interval between blood meal and egg laying induction, as well as the procedure adopted for obtaining eggs, varied according to the species.

*Aedes aegypti* and all anopheline females were anaesthetized in ice three to four days after blood feeding. Groups of five to ten anaesthetized females were then rapidly transferred to upside down 8.5 cm diameter Petri dishes, where the lid became the base. This base was internally covered with Whatman No. 1 filter paper. After the females regained activity, a process that took 3–10 minutes, the filter paper was soaked with the same water employed to rearing

each species, thus stimulating the laying of the eggs that were deposited individually or in small disorganized groups. In the case of *An. gambiae*, females also laid eggs on filter paper soaked in an aqueous solution containing 100  $\mu$ M of L-Ascorbic Acid (Sigma # A92902) and 500  $\mu$ M of Benserazide (DL-Serine 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl)hydrazide) (Sigma # B7283). This solution was prepared immediately before use and kept in the dark during all the procedure. Benserazide inhibits DDC thus blocking the process of melanization (Fig 1B) [9] while ascorbic acid prevents benserazide oxidation.

Groups of five to ten *Cx. quinquefasciatus* females were anaesthetized in ice five to six days after the blood meal and then transferred to 8.5 cm diameter Petri dishes in the normal position (not upside down) without filter paper. After insect recovery, dechlorinated water was added with the aid of a micropipette through a small hole in the lid until the females were pressed against it, which stimulated egg laying. A second small hole was present in the lid to allow air outlet while water was being introduced. Eggs were deposited in organized rafts containing from few dozens to hundreds of eggs.

In all cases egg laying lasted one hour in the dark, inside an incubator at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Petri dishes were then opened inside a large cage where the females were released. Eggs were allowed to develop at  $25^\circ\text{C}$  until being employed in the experiments. For *Ae. aegypti* and anopheline eggs the sides of the Petri dishes were sealed with parafilm, in order to avoid water evaporation. For *Cx. quinquefasciatus* eggs, rafts were kept intact prior to the first experimental point, when they were transferred to Petri dishes whose base was covered with Whatman No. 1 filter paper soaked with dechlorinated water. Rafts were carefully disrupted and the eggs were spread with the aid of a painting brush.

### Ethics statement

The procedure and use of live chicken followed the UF-IACUC Protocol no. 201003892. The procedure and use of anaesthetized guinea pigs was reviewed and approved by the Fiocruz institutional committee 'Comissão de Ética no Estudo de Animais' (CEUA/FIOCRUZ), license number: L-011/09.

### Eggshell darkening analysis in *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*

Eggs at approximately 80% of embryogenesis completion had their exochorion removed with bleach (NaOCl, 6% active chlorine) treatment for one minute followed by three washes with dechlorinated water and were kept in moist filter paper until hatching. These exochorion-depleted eggshells (i.e. composed of an outer endochorion and an inner serosal cuticle) were then transferred into a microscopy slide and bright field images were obtained with a digital imaging acquisition system coupled to a Zeiss Axio Scop 40 microscope. Two experiments per species were performed, each one consisting of at least 9 eggshells. The image acquisition setup was the same, in both the microscope and the computer, for all images. Eggshell melanization degree was evaluated employing the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) with the 'Measure' function within the 'Analyze' menu. This function calculates the mean densitometric value of the selected area in an 8-bit grey scale, i.e. a completely white and a completely black pixel have, respectively values of 255 and 0. Representative circular regions were selected, always close to the hatching line. The densitometry of each eggshell was subtracted against the densitometry of a fixed circular region of non-saturated white background (with a value of 232). Densitometry values were then inversed (i.e. a white and a black pixel measuring, respectively, 0 and 255) and darkening percentages were calculated, assuming the mean value of *Ae. aegypti* eggshells as 100%.

### Detection of serosal cuticle formation in *An. quadrimaculatus*

Serosal cuticle synthesis was evaluated in both WT and GORO strains of *An. quadrimaculatus* employing two approaches: air drying and bleach treatment, as previously described for the other mosquitoes [17–19].

For the air-drying assay, eggs at distinct stages of embryogenesis (comprising seven time points in total, see the egg shrinkage experiment shown on the Results section 'An. quadrimaculatus GORO embryogenesis is normal, despite its impaired melanization' for details) were blotted onto a dry Whatman No. 1 filter paper to remove all water. Eggs were then left drying on air for 15 minutes, when shrunken or intact eggs were counted under a stereomicroscope. For each time point and each strain, three independent experiments were performed, each replicate consisting of 30 synchronized eggs. Experiments were performed at 25°C and the relative humidity varied between 65 and 75%.

Incubation with bleach for several minutes digests both the egg exochorion and endochorion while leaving the serosal cuticle intact. Synchronized *An. quadrimaculatus* eggs from both strains were treated with bleach (6% active chlorine) during 3–10 min at different stages of embryogenesis, before and after the abrupt change in egg permeability (detected through the air-drying experiment described above). The resulting material was analyzed under a stereomicroscope (MIA 3XS S/N 0342, Martin Microscope Company) with an Olympus U-CMAD3 U-TV1X 2 adapter and Nikon CodPix 5400 camera, coupled with a digital image acquisition system. For each strain and time point two independent experiments, each with at least 20 eggs, were performed.

### Definition of the end point of *An. quadrimaculatus* embryogenesis

The total period necessary for embryonic completion in both WT and GORO strains was defined as previously described for other mosquitoes [19,28]. Two hours before the (empirically) estimated hatching of the putative first larva, eggs were flooded with a solution of 150 mg/ 100 mL yeast extract (SIGMA # Y1625) prepared in tap water. Egg eclosion was counted hourly, until no more hatchlings were observed. Twenty four hours after the eclosion of the last putative larvae the samples were checked again to confirm that total hatching was recorded. The embryogenesis end point was defined as the period necessary to hatch 50% of total larvae. For each strain, three independent experiments, each with 120 eggs, were performed.

### Embryo viability under dry conditions

Except for *An. gambiae*, all species and strains were employed in this experiment. In each case, groups of 40 or 50 synchronized eggs, obtained as explained above (see above the [Methods](#) section 'Synchronous egg laying'), were removed from water and blotted onto dry Whatman N° 1 filter paper with the aid of a paint brush, at specific moments of embryogenesis (see below the [Results](#) section 'Egg resistance to desiccation after serosal cuticle formation is enhanced by melanization' for details). Eggs remained developing in this dry environment for 2, 5, or 10 hours. After these periods, eggs were transferred back to moist conditions until embryogenesis completion. In all experiments the total test interval ("wet-dry-wet") was shorter than the period necessary for embryogenesis completion. Egg viability was quantified through larval hatching, induced with 150 mg/ 100 mL yeast extract solution [19,28], prepared with the same water used for larvae rearing (see above the [Methods](#) section 'Mosquito sources and rearing'). Larval eclosion was recorded hourly until no more hatchlings were observed for two successive hours. Total larval hatching was confirmed 24 hours later.

Viability control samples containing at least 120 eggs, kept continuously in moist filter paper until the end of embryogenesis, were employed in all cases. Experimental data were

normalized with these controls, whose hatching was induced with yeast extract solution (150 mg/ 100 mL).

Three independent experiments were performed for each species or strain, using triplicates at least, inside an incubator at 25±1°C. Relative humidity varied between 60 and 80% for both *An. quadrimaculatus* strains and between 20 and 55% for all other species.

### Statistical analysis

For the analysis of eggshell darkening, air drying, embryogenesis period and embryonic viability under dry conditions the adequate sample size (n) of each experiment was defined from preliminary experiments. For all these experiments, eggshells or eggs were randomly collected from the filter paper (see above the [Methods](#) section 'Synchronous egg laying'). Outliers were removed after Dixon's Q test. Kruskal-Wallis Nonparametric Test ( $P < 0.0001$ ) was used in eggshell melanization analysis, One Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's Multiple Comparison Test ( $P < 0.05$ ) was used in the egg viability experiments and the Student's t-test ( $P < 0.001$ ) was used to compare viability between the two *An. quadrimaculatus* strains. All statistical analyzes, except Dixon's Q test, were made using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## Results

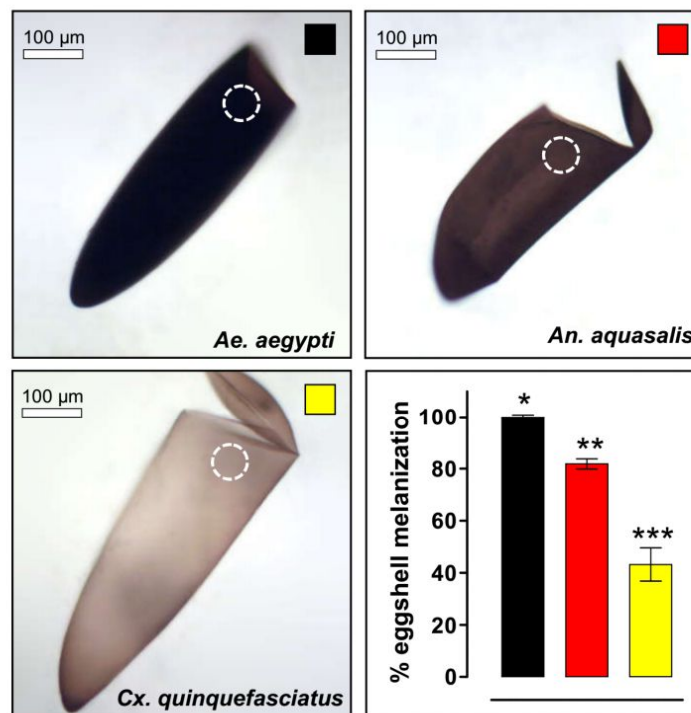
### Levels of eggshell melanization and egg resistance to desiccation (ERD) are directly related

The ERD, defined as the capacity of an egg to sustain its viability outside the water [29,30], varies among mosquito species at the end of embryogenesis (Fig 1C) [19]. In order to evaluate if these viability differences could be explained by egg pigmentation, the degrees of melanization of hatched eggshells (without exochorion, see [Methods](#)) of *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* were assessed (Fig 2). Eggs of *Ae. aegypti* and *An. aquasalis* present a homogeneous pigmentation, while *Cx. quinquefasciatus* eggs are more pigmented near its extremes. In spite of this, *Ae. aegypti* exhibits the greater eggshell pigmentation, followed by *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*.

Although establishing a direct relationship between eggshell pigmentation and ERD is tempting, other eggshell related factors, such as differences in thickness or components of the endochorion or the serosal cuticle, might account for this distinctness [1,2,9,20,31]. Moreover, since we are studying mosquitoes of different genera, whose common ancestor occurred ~217 million years ago [32], embryological and egg traits vary considerably [19,20] and may not be comparable (see [Discussion](#)). In order to directly evaluate the relationship between melanization and ERD without any other confounding factor, we took advantage of a mutant strain of the species *An. quadrimaculatus*, which shows a significant melanization deficit: the GORO strain.

### *An. quadrimaculatus* GORO embryogenesis is normal, despite its impaired melanization

The mosquito *An. quadrimaculatus* is endemic to the Eastern part of North America, being a primary vector of malaria in this region [33]. The wild type strain of this species presents a dark-brown, melanized eggshell and a dark-brown cuticle in larval, pupal and adult stages (Fig 3A–3D). On the other hand, the GORO strain carries a *golden cuticle* mutation, which causes poor body melanization in all life stages [34], within a *rose eye* background (see [Methods](#)), (Fig

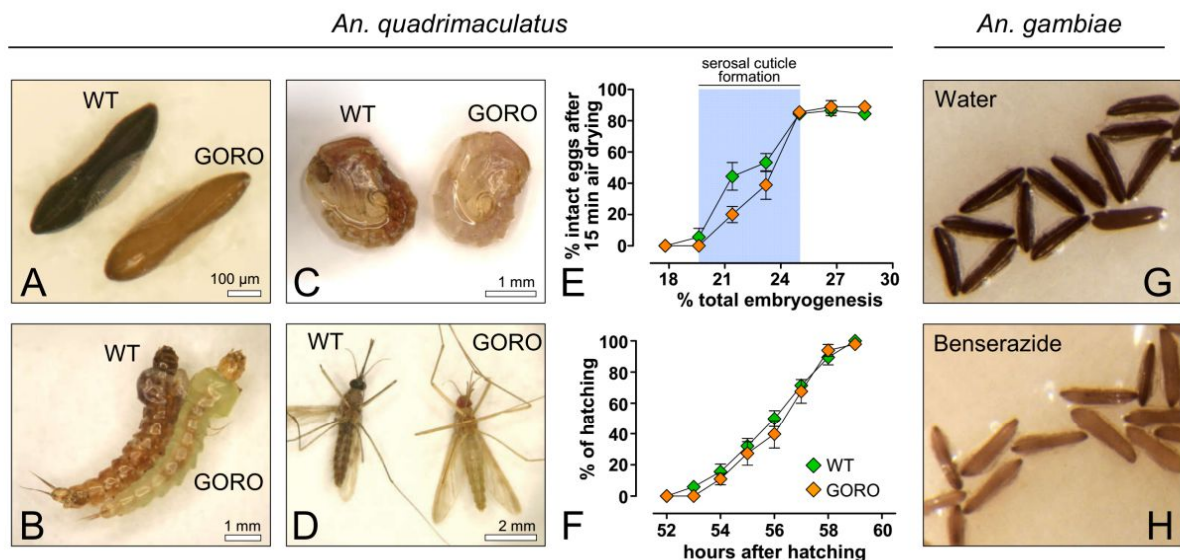


**Fig 2. Mosquito eggshell melanization varies among species.** Melanization degree was quantified in empty eggshell images obtained with bright field microscopy employing the ImageJ software (lower right graphic). The maximum melanization level was arbitrarily attributed to *Ae. aegypti* eggshells. The measured region, always near the hatching line, is indicated by dashed white circles. A direct correlation between melanization and ERD degree occurs (compare with Fig 1). Values represent the mean  $\pm$  s.d. of two experiments, each consisting of at least 9 eggshells. All observed differences are statistically significant (Kruskal-Wallis,  $P < 0.0001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063.g002>

3A–3D). In order to assess whether the lack of proper melanization compromises embryogenesis, two embryonic traits were analyzed in WT and GORO: the chronology of serosal cuticle formation and the completion of embryogenesis (Fig 3E and 3F and Fig 4). Serosal cuticle formation, assessed through the abrupt acquisition of resistance to egg shrinkage (Fig 3E) and bleach digestion (Fig 4), as previously described in other mosquito species [17,19], occurs in between 19.6 and 25% of total embryogenesis, at the stage of complete germ band elongation (Fig 4), in both strains. Likewise, the period necessary for entire embryogenesis, approximately 56 hours after egg laying, is similar in both strains (Fig 3F), as well as the viability percentage (mean  $\pm$  s.d.):  $58.1 \pm 4.7\%$  for WT and  $53.3 \pm 8.8\%$  for GORO. To confirm that the dark pigment of *Anopheles* eggs is due to the production of melanin, and not of other pigment, eggs of *An. gambiae* were laid on water or on a benserazide solution, an inhibitor of DDC [9], that participates in the melanization pathway (Fig 1B). While eggs laid on water turn from white to dark-brown (Fig 3G), those laid on the benserazide solution turn from white to yellow (Fig 3H), phenocopying the GORO mutation of *An. quadrimaculatus*. Therefore, the lack of melanization in the *An. quadrimaculatus* GORO mutant does not compromise neither serosal cuticle formation nor the total period necessary for embryogenesis completion.



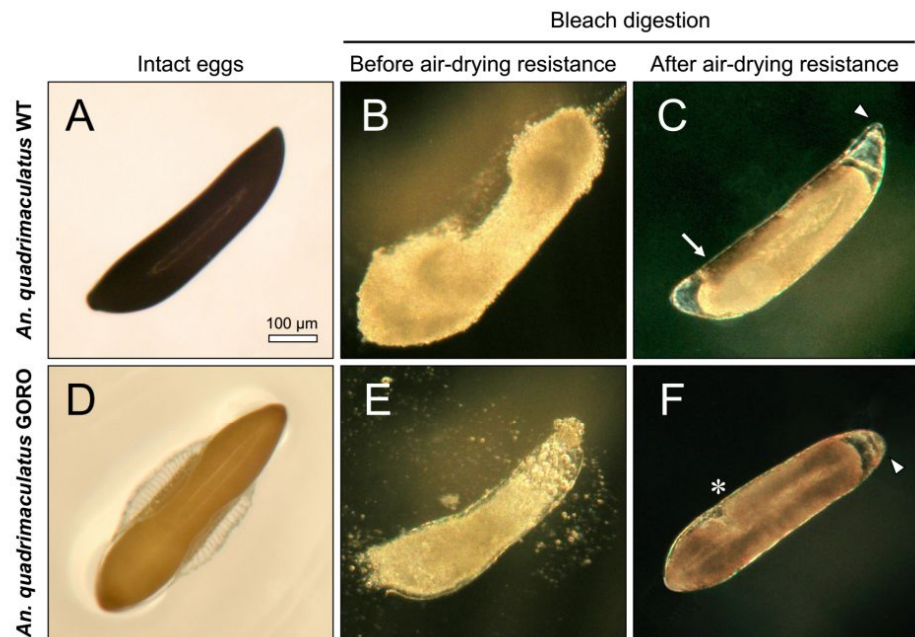


**Fig 3. Embryogenesis of the weakly pigmented *Anopheles quadrimaculatus* GORO strain proceeds similarly to the WT.** GORO means 'Golden cuticle and ROse eyes'. (A) eggs, (B) larvae, (C) pupae and (D) adults. (E) Eggs at different embryonic ages developing at 25°C were air-dried for 15 minutes and the percentage of eggs that did not shrink (i.e. intact eggs) was then registered. Relative humidity ranged between 65 and 75%. The abrupt alteration in egg permeability is coupled with serosal cuticle formation, highlighted by a blue stripe (see Fig 4). Each lozenge represents mean ± s.e. of three independent experiments, each one with 30 eggs per time point (total of 630 eggs per strain) (F) Cumulative larval hatching at 25°C; data were normalized by total eclosion, obtained 24 hours after the expected embryogenesis completion. Each curve represents mean and standard error of three independent experiments consisting of 120 eggs each (total of 360 eggs per strain). (G, H) The lack of proper melanization can be phenocopied in the mosquito *An. gambiae*: while eggs laid in water become dark-brown (G), those laid on a benserazide solution, a melanization inhibitor (Fig 1B) develop a golden color (H).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063.g003>

### Egg resistance to desiccation after serosal cuticle formation is enhanced by melanization

The interspecific difference in egg viability when these are placed outside the water at late embryogenesis (Fig 1C) [19] might be due to other factors, unrelated to the eggshell and its serosal cuticle. For instance, it could be caused by specific metabolites inside the egg or present in the pharate larvae, such as glycerol, trehalose, glycogen or triacylglycerols, or to significant variation in the larval cuticle structure [29,30,35–37]. Thus, we uncoupled serosal cuticle participation in ERD from other factors. Eggs from the different mosquito species and strains were removed from the water at different stages of early embryogenesis and left developing outside the water for two, five or ten hours. Hatching rates were assessed at the end of embryogenesis (Fig 5 and Table 1). In all cases serosal cuticle formation significantly increases egg viability outside the water (ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test,  $P < 0.05$ ). The role of the serosal cuticle on ERD of *Ae. aegypti* left up to ten hours in a dry environment is partial: the serosal cuticle elevates embryo viability from 30–50% before its formation to 68–81% right after its synthesis. However, all *Ae. aegypti* eggs die if remaining outside the water for 25 hours prior to serosal cuticle formation [17]. In *Anopheles* species and strains the serosal cuticle formation is essential: egg viability in dry conditions is null before, but increases considerably after serosal cuticle synthesis, as previously described for *An. quadrimaculatus* [38] and *An. gambiae* [18]. In both *Ae. aegypti* and *An. aquasalis* the hatching rate in each stage is



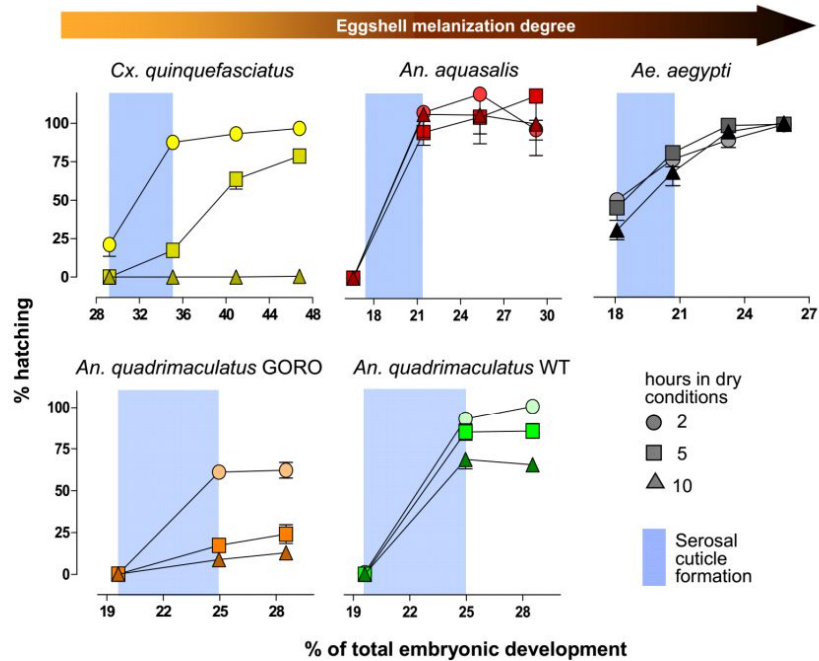
**Fig 4. Resistance to air-drying is related to serosal cuticle formation in both *An. quadrimaculatus* strains.** Serosal cuticle presence was determined by chorion digestion driven by bleach (6% active chlorine). (A, D) Intact eggs. (B, E) Eggs treated with bleach before acquisition of air-drying resistance are totally digested while (C, F) eggs exposed to the same procedure after acquisition of air-drying resistance remain intact due to the presence of the serosal cuticle (see Fig 3E). Arrow: endochorion remnants not yet digested; arrowheads: serosal cuticle boundaries; asterisk: posteriormost end of the germ band. All images are in the same magnification.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063.g004>

equivalent for all dry exposure periods. Regarding *Cx. quinquefasciatus*, 20% of the eggs left outside the water for two hours before serosal cuticle synthesis survive but similar aged eggs exposed to a dry environment for longer periods do not. Moreover, egg viability after serosal cuticle formation is inversely proportional to the exposure period outside the water. Interestingly, in both *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*, a gradual increase in embryo viability was observed after serosal cuticle formation, suggesting this structure follows a process of maturation until it becomes completely functional. Regarding *An. quadrimaculatus*, in both strains the percentage of viable eggs is inversely associated with the dryness period. In all conditions after serosal cuticle formation, GORO eggs are far more sensitive to dehydration than wild type ones (Student's t-test,  $P < 0.001$ ). For instance, at 25% of total embryogenesis and when left for 5 hours in a dry environment, the hatching rate of WT and GORO strains are, respectively, 85 and 17%.

In this assay the viability of the control samples kept moist throughout development was as follows (mean  $\pm$  s.d.):  $65.8 \pm 8.0$  for *Ae. aegypti*,  $87.1 \pm 8.6$  for *Cx. quinquefasciatus*,  $64.9 \pm 15.3$  for *An. aquasalis*,  $59.2 \pm 4.7$  for *An. quadrimaculatus* WT and  $56.7 \pm 10.2$  for *An. quadrimaculatus* GORO.

The increased eggshell susceptibility to water loss of the *An. quadrimaculatus* mutant was further confirmed via a collapsing experiment employing ethylene glycol, a cryoprotectant [26,27]. In this experiment, the strain employed was the MRA-123 (GOCUT), containing only the mutation with the *golden cuticle* phenotype, without the mutation of the rose eye



**Fig 5. Mosquitoes with darker eggshells resist more to desiccation.** Mosquito eggs were laid on water. Values in the x-axis indicate the moment that eggs were transferred to dry conditions, staying outside the water for 2, 5 or 10 hours. Eggs were then returned to moist filter paper until completion of embryo development, when hatching rates were evaluated. Data were normalized regarding to control samples, kept on moist conditions throughout development. Blue stripes indicate the serosal cuticle formation period (as shown in Figs 1 and 3). Each point represents mean  $\pm$  s.e. of three independent experiments consisting of at least 120 eggs each. A total of at least 3,240 eggs were employed for each species or strain. In all cases viability was significantly different between the two first experimental points (i.e. before and after serosal cuticle formation) (ANOVA followed by Tukey's test,  $P < 0.05$ , see Table 1); the exception being *Cx. quinquefasciatus* at 10 hours in dry conditions. After serosal cuticle formation, *An. quadrimaculatus* GORO eggs were less viable than WT ones under equivalent conditions, in all cases (Student's t-test,  $P < 0.001$ ). All experiments were conducted at 25°C and relative humidity of 60–80% (*An. quadrimaculatus*) or 20–55% (other species).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063.g005>

phenotype. In the presence of ethylene glycol, *An. quadrimaculatus* GOCUT eggs lose water faster than *An. quadrimaculatus* WT ones (Denise Valle, personal communication). This experiment also shows that the higher water loss susceptibility is associated only with the lack of proper melanization, having no relation with the eye pigment mutation.

## Discussion

### Regarding the *Anopheles quadrimaculatus* GORO strain

The existence of the *An. quadrimaculatus* GORO strain allowed to demonstrate that egg resistance to desiccation in mosquitoes is heavily dependent on serosal cuticle formation and, at the same time, that eggshell melanization positively impacts the egg survivorship outside the water. Although this interesting strain exists for at least 16 years [34], this is the first peer-reviewed report employing GORO. The genetics of the *golden cuticle* mutation (GOCUT) present in the *An. quadrimaculatus* GORO is currently unknown. The enzymes N- $\beta$ -alanyl dopamine

**Table 1. Egg viability of mosquito species and strains under dry conditions during embryogenesis, before and after serosal cuticle (SC) formation.**

Species or strain	Hours under dry conditions	Stage of embryogenesis <sup>#</sup>			
		Before SC formation	After SC formation I	After SC formation II	After SC formation III
<i>Ae. aegypti</i>	2	50.0 ± 32.4 <sup>a</sup>	76.4 ± 16.9 <sup>b</sup>	88.9 ± 16.8 <sup>b</sup>	98.9 ± 11.5 <sup>b</sup>
	5	44.9 ± 28.3 <sup>a</sup>	80.6 ± 10.5 <sup>b</sup>	98.3 ± 15.6 <sup>b</sup>	99.1 ± 14.1 <sup>b</sup>
	10	30.2 ± 21.3 <sup>a</sup>	67.9 ± 30.4 <sup>b</sup>	94.3 ± 13.4 <sup>c</sup>	100.0 ± 17.9 <sup>c</sup>
<i>An. aquasalis</i>	2	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	107.8 ± 33.4 <sup>b</sup>	119.7 ± 56.7 <sup>b</sup>	96.7 ± 11.5 <sup>b</sup>
	5	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	94.8 ± 24.9 <sup>b</sup>	104.8 ± 52.2 <sup>b</sup>	118.6 ± 47.3 <sup>b</sup>
	10	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	106.6 ± 44.6 <sup>b</sup>	106.2 ± 36.8 <sup>b</sup>	100.3 ± 31.1 <sup>b</sup>
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	2	21.1 ± 22.8 <sup>a</sup>	87.6 ± 12.3 <sup>b</sup>	93.1 ± 10.2 <sup>b</sup>	96.7 ± 7.3 <sup>b</sup>
	5	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	17.4 ± 8.8 <sup>b</sup>	63.7 ± 19.4 <sup>c</sup>	78.7 ± 10.3 <sup>c</sup>
	10	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.9 <sup>b</sup>
<i>An. quadrimaculatus</i> WT	2	1.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	92.9 ± 11.4 <sup>b</sup>	106.6 ± 10.2 <sup>b</sup>	N.D.
	5	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	84.8 ± 14.9 <sup>b</sup>	85.5 ± 13.1 <sup>b</sup>	
	10	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	68.5 ± 16.9 <sup>b</sup>	65.3 ± 11.3 <sup>b</sup>	
<i>An. quadrimaculatus</i> GORO	2	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	60.9 ± 6.4 <sup>b*</sup>	62.0 ± 14.0 <sup>b*</sup>	N.D.
	5	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	17.2 ± 9.2 <sup>b*</sup>	23.9 ± 16.8 <sup>b*</sup>	
	10	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	8.7 ± 7.4 <sup>b*</sup>	12.8 ± 7.1 <sup>b*</sup>	

<sup>#</sup> The stages of embryogenesis are indicated in the x-axis of Fig 5.

Values represent mean and standard deviation of at least three independent experiments for each species and period under dry conditions. Every experiment employed a total of at least 120 eggs for each point and for each species or strain. Hatching percentages were normalized according to control samples kept moist throughout development.

<sup>a, b, c</sup> Different letters represent significant differences among the distinct stages of embryogenesis in the same drying period and for the same species or strain (ANOVA, followed by Tukey's test P<0.05).

\* Asterisk means significant differences between *An. quadrimaculatus* WT and GORO strains in the same drying period and for the same stages of embryogenesis (Student's t-test, P < 0.001).

N.D.: Not determined.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063.t001>

hydrolase (*tan*) and DCE (*yellow*), both present in the melanization pathway [15] (see also Fig 1B) do not seem to be related to the GORO mutant as determined by biochemical assay (Paul Howell, personal communication). Despite this, we worked on a development window within which the parameters of physiology and viability that are relevant to our biological question are equivalent between the wild *An. quadrimaculatus* and the GORO mutant. Given that melanization is also associated with immunity, it would be interesting to evaluate how the GORO strain responds immune challenges in adults, larvae and eggs [39,40].

It is worth mentioning that it would not be possible to use the same approach, at least with *Aedes* mosquitoes: the mutants *bronze* and *gray*, presenting altered egg color, are embryonic lethal [41], as well as gene silencing for *Laccase 2*, whose white eggs never darken [14]. In addition, the administration of  $\alpha$ -MDH ((DL)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydrazino-2-methylpropionic acid, also named D,L Carbidopa) or benserazide, inhibitors of DDC activity, impedes eggs to darken completely, rendering tanned eggs (i.e. with a yellow/golden color, similar to GORO eggs); however these less melanized eggs are not viable [12,42]. Sometimes these non-melanized, non-sclerotized eggs burst [14] most likely due to the fragile egg-shell that does not bear the amount of water absorbed. Since *Laccase2* and DDC are in the melanization pathway (Fig 1B), the fact that their absence impedes mosquito eggs to darken shows that this dark pigment is due to the production of melanin.

## The role of egg color in insects

Insect eggs occur in a myriad of colors, ranging from white to black with tones of yellow, orange, red, pink, green and brown, among others. Egg color may occur uniformly or in patches throughout the eggshell, or can appear in restricted areas [35]. These colors are produced by pigments such as melanins, sclerotins, ommochromes, pteridines, carotenoids and flavonoids [23,43].

Egg colors are associated with defense strategies against predators, such as homochromy, mimicry, camouflage, visual disruption and warning (aposematic) signaling [35]. Females of the bug *Podisus maculiventris* selectively control egg color during oviposition: darker and lighter eggs are laid on the upper and lower surface of leaves, respectively. The dark pigment protects eggs against the deleterious effects of UV light emitted from the sun [44].

This list is further expanded with melanin participation in the egg resistance to desiccation (ERD). The ERD trait has been associated with the staggering adaptive success insects show on land [45,46]. Two questions arise from the above considerations. A direct exposition to sunlight also increases evaporation of eggs [35]: does the dark pigment selectively present in eggs of *P. maculiventris* also protect against desiccation? In relation to the other non-melanin pigments; do they also protect insect eggs and cuticles in post-embryonic life stages from water loss?

## Melanin and desiccation resistance in adult insects

The melanin contribution for desiccation resistance has been previously described in adult insects: Kalmus [22] compared the desiccation resistance in adults of wild type and *yellow*, *ebony* and *black* mutants of the *Drosophila melanogaster* fly. The wild type cuticle is melanized, the cuticle of *yellow* mutants is light brown/yellowish (i.e. with a tanned color) and the cuticle of *black* or *ebony* mutants is darker than wild type ones. The more melanized a fly is, the more it resists desiccation. The *DCE/yellow* gene is related to the activity of Dopachrome conversion enzyme, required for proper melanin formation. Both *black* and *ebony* genes code for enzymes necessary for NBAD production, driving dopamine usage for sclerotization, instead of melanization (Fig 1B); i.e. *black* and *ebony* mutants are defective in the sclerotization pathway and present a cuticle darker than the wild type one [15]. The same pattern was found in distinct species and morphs of *Hemideina wetas* from New Zealand and morphs of *D. melanogaster* from the Indian subcontinent: darker adults resist more against desiccation [24,25]. In the beetle *Tribolium castaneum* silencing of the gene *yellow-e* (*TcY-e*) leads to desiccation sensitivity of adults. These adults survive when reared at high humidity but, intriguingly, develop a slightly darker cuticle [47].

On the other hand, populations of *D. melanogaster* artificially selected for increased pigmentation do not resist desiccation more than control flies [48]. This apparent incoherence might be due to other factors, since the reduction in the rate of water loss by the cuticle is one out of the three aspects of the desiccation resistance (see below). Other explanation could be associated with the physicochemical properties of the melanin produced.

## How does melanin protect insect structures against desiccation?

Melanin might protect against desiccation due to its covalent or noncovalent interaction with other biomolecules such as proteins and chitin [15]. If this is the case, this association is distinct from sclerotization-driven crosslinking: both *black* and *ebony* *D. melanogaster* mutants are more melanized and present a cuticle that is less stiff and puncture-resistant (i.e. less sclerotized) than wild type ones [49]. Similarly, the elytral cuticle of *T. castaneum* *black* mutants are more viscous and less stiff than wild type ones [50].

Another hypothesis is that melanin might be hydrophobic and thus hamper water flux through the cuticle, as recently suggested [48]. Although both melanin precursors (DHICA and DHI, Fig 1B) are hydrophilic compounds, the molecular structure of melanin polymers varies depending on the biochemical conditions of polymerization and, therefore, "melanin" is a diffuse term for a rather diverse group of complex pigments [10,15,51–53]. In fact, there exists in the literature descriptions of melanin being both water-soluble [54] and water-insoluble [53]. Thus the *D. melanogaster* darker-selected populations might not have a higher desiccation resistance [48] due to the production of "hydrophilic melanins" in this specific situation.

A third hypothesis is that melanin might act decreasing the eggshell porosity, as suggested by experiments performed in fungus. In ascomycetes the melanin produced and deposited in the chitin-containing cell wall increases desiccation resistance [55]. This occurs, most likely, due to the decrease in the cell wall porosity conferred by melanin [56].

Independent of the mechanism, the eggshell of GORO eggs loses water more rapidly than the eggshell of WT eggs, as mentioned above.

In any case, although melanization in some instances increases desiccation resistance, as shown in the present work, this is not an universal rule [57], as exemplified below for other insect eggs.

### Melanin localization in the eggshell and other egg traits related to desiccation resistance

In any organism, an increase in resistance to desiccation is associated with three aspects: a higher initial body water store, a reduction in the rate of water loss and an increase in the tolerance to water loss [24,29,30,37]. Right after being laid on water, *Ae. aegypti* eggs promptly uptake water, increasing in weight and volume until the serosal cuticle is formed [21] and most likely the same happens with *Anopheles* and *Culex* eggs [20].

In mosquitoes, the role of eggshell in ERD is related to the reduction in the rate of water loss. The outermost mosquito eggshell layer is the exochorion, a delicate layer that easily detaches from the endochorion and does not participate in ERD [9,20]. Although the endochorion visibly melanizes, the serosal cuticle below it might also do so. In previous works our group has shown images of transparent serosal cuticles from different mosquito species [17–20]. However, these cuticles were obtained through bleach treatment, which digests the chorion. During this process, the bleach-resistant serosal cuticle might get unpigmented. In the mosquito *An. gambiae*, the serosal cells, which produce the serosal cuticle, express *tyrosine hydroxylase* and *dopa decarboxylase* genes [18], coding for enzymes related to both melanization and sclerotization pathways (Fig 1B) [15,23]. Beckel demonstrates that mosquito eggs without exo and endochorion exhibit a permeable serosal cuticle. Together with the known permeability of eggs before secretion of the serosal cuticle, it seems that the endochorion-serosal cuticle bonding is the functional entity responsible for reducing water loss [58]. This bonding would occur through crosslinking quinones derived from the sclerotization, through interactions with melanins [15,49], or both. In any case, the higher amount of water lost by a mosquito egg leads to a lower hatchability [21].

A moderate level of ERD before serosal cuticle formation was observed in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, but not in *Anopheles* spp.. This feature cannot be associated with the presence of melanin since it is observed in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* that have opposite levels of eggshell melanization, while *Anopheles* spp. have intermediate levels. This viability might be due to an increased tolerance to water loss or a higher initial egg water content. Indeed, the percentage of eggshell weight in relation to total egg weight suggests that total body water content is lower in *An. aquasalis* [20].

Notwithstanding, color traits related to the decrease in water loss evolve differentially in other insect eggs. The eggshells of the cricket *Acheta domesticus* and the beetle *Tribolium castaneum* are transparent. In *A. domesticus* the molecules dopa, dopamine and NADA, (Fig 1B), are present in the serosal cells and cuticle most likely participating in the sclerotization pathway [59]. In *T. castaneum* the serosal cuticle is fundamental for ERD [46] and gene silencing of *Laccase2*, related to both melanization and sclerotization (Fig 1B) [15] diminishes the ERD level of this beetle [60].

## Evolution and ecology of resistance to desiccation in mosquito eggs

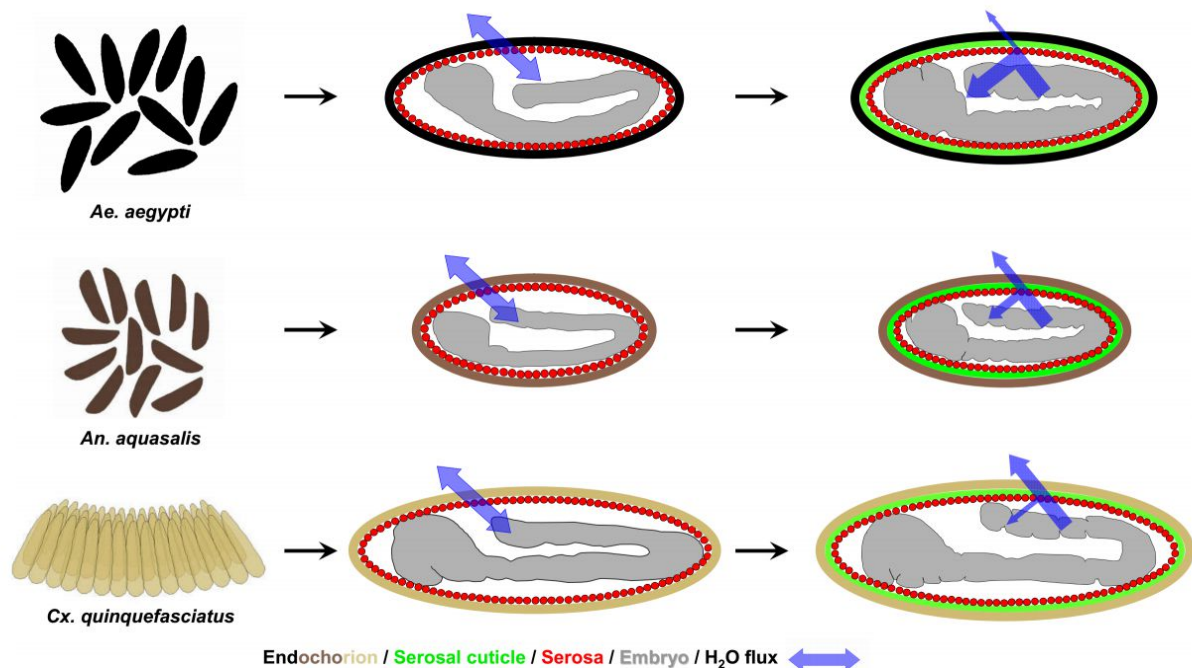
Mosquitoes of *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* genera shared a last common ancestor ~217 million years ago. The subfamilies Culicinae (containing *Aedes* and *Culex* genera) and Anophelinae have separated ~204 million years ago [32]. Within this time span the level of pigmentation has greatly diverged, to the point where *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, more closely related among themselves than *Anopheles* species, show the highest divergence in levels of eggshell pigmentation and desiccation resistance.

In mosquitoes, egg resistance to desiccation is a trait that guarantees survival in hostile environments and enables population growth and spread to new habitats [61,62]. In the case of *Ae. aegypti*, with a high ERD, this implicates in vector dispersion and promotes transmission of diseases such as chikungunya [6], dengue [7] and Zika [5]. Mosquito species with increased ERD are contained in a few genera (*Aedes*, *Haemagogus*, *Ochlerotatus*, *Opifex* and *Psorophora*), adding to about 30% of all described species [61].

*Aedes aegypti* shows an outstanding success in keeping its eggs viable outside the water, up to 8 months in the dry [1,2]. There is even a report that shows hatching of *Ae. aegypti* eggs after 15 months, when kept at 9°C [63]. Indeed, more detailed analysis reveals this hatching success is directly related to higher relative humidity [21]. The present results show that the increased *Ae. aegypti* eggshell melanization is one of the traits responsible for the extremely high ERD seen in this species (Fig 6).

Although species from other genera such as *Culex* and *Anopheles* show a less striking ERD [2,19], this trait might still be relevant for survival, at least for Anopheline species. Eggs of *Anopheles* mosquitoes are viable on a dry surface for approximately one day after the end of embryogenesis (Figs 1C and 6) [19,38]. However, when left at humid soil, egg viability increases up to 7 and 18 days in *An. quadrimaculatus* and *An. arabiensis*, respectively [64–66]; other species resist for even longer periods [2]. Anopheline egg survival in soil is crucial for sustaining the mosquito life cycle during the dry season and thus the maintenance of malaria transmission [67–69]. Moreover, adults from species of the *An. gambiae* complex show distinct levels of resistance to desiccation [37,70]. As a future prospect, it would be interesting to evaluate if these species have distinct levels of melanization in their eggshells and adult cuticles.

Females of *Cx. quinquefasciatus* oviposit in rafts containing from few dozens to hundreds of eggs arranged along their longitudinal axis. Eggs internal to the raft structure bear sides protected by contact with other eggs; their anterior region contacts the water film, and the posterior tip is the only region in contact with the air [2,71]. Beyond being darker than other eggshell regions (Fig 2), the posterior tip is the only endochorion region whose surface is rough and irregular, similar to the whole endochorion of *Ae. aegypti* eggshells [20]. Given that *Culex* eggs at raft edges were found dead after exposure to strong dry winds [2], it seems that the raft per se can act as a protection against dehydration, according to the egg cluster-desiccation hypothesis [72]. This could relax the selection pressure of other traits related to ERD, such as serosal cuticle efficiency and eggshell pigmentation, with the exception of the posterior tip. The occurrence of a higher rate of water loss through the *Culex* eggshell might be



**Fig 6. Mosquito vectors egg-laying behavior and water flux through the eggshell before and after serosal cuticle formation.** From top to bottom, leftmost panel: while *Ae. aegypti* and *An. aquasalis* females lay their eggs individually, the females of *Cx. quinquefasciatus* lay their eggs as an organized raft that floats on the water surface. In all species, before serosal cuticle formation water passes freely through the eggshell. Serosal cuticle formation diminished water passage through the eggshell in a color-dependent manner: while in *Ae. aegypti*, with a black endochorion, most of the water is retained inside the egg, in *An. aquasalis*, with a dark-brown endochorion, some of the water is retained inside the egg, but not all. Finally, in *Cx. quinquefasciatus*, with a light-brown/light-tanned endochorion, most of the water escapes and only a small portion of it is retained inside the egg. The depicted embryonic morphology are representative for each stage and species [19] and egg sizes among species are depicted in their natural proportion [20]. For the sake of simplicity, the outermost eggshell layer (the exochorion) and the other extraembryonic membrane (the amnion) are not depicted here. The exochorion does not participate in the ERD [20].

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063.g006>

advantageous, in the context of a more efficient gas exchange and a increased defense against pathogens, as previously discussed [19].

In summary, eggshell melanization and serosal cuticle formation increase egg protection against water loss (Fig 6). However, we do believe that the differential egg resistance to desiccation observed in distinct mosquito species is a trait with multifactorial origins. For instance, among *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* species, there are differences regarding egg size, volume, surface area and weight, eggshell surface density and weight, endochorion surface aspect and also a tendency in differences regarding eggshell chitin content [20]. Endochorion thickness also varies among species [1,2,9,31] as well as the embryonic stage of serosal cuticle formation and the total period of embryogenesis [19]. Therefore other factors might also contribute such as the thickness and texture of the distinct eggshell layers and the parental investment, observed in *Culex* species.

### Conclusions

Our results demonstrate that, in mosquitoes, the eggshell melanization level is directly associated with egg viability outside the water after serosal cuticle formation. Decoding the



association between egg coloration and resistance to desiccation is relevant for studies concerning ecology and evolution of mosquitoes and other insects. Since eggshell and adult cuticle pigmentation ensure survivorship for some insects, they should be considered regarding species fitness and also for the control and management of vector or pest insects [73,74].

## Acknowledgments

The following mosquito strains were obtained through the MR4 as part of the BEI Resources Repository, NIAID, NIH: *An. quadrimaculatus* ORLANDO, MRA-139 and *An. quadrimaculatus* GORO, MRA-891, both deposited by MQ Benedict. We thank Dr. Phil Lounibos and the staff of the FMEL for the space and all assistance for the accomplishment of the experiments with *An. quadrimaculatus*. We thank Maria Cristina Carrasquilha, Tanise Stenn, Erick Blosser and Gabriela Maxxine for the assistance in rearing the *An. quadrimaculatus* strains. We are also grateful to Dr. Peter Mazur (*in memoriam*), in whose laboratory the experiments with *An. gambiae* and *An. quadrimaculatus* GOCUT (MRA-123) were performed. We thank all the staff at LAFICAVE for the assistance in obtaining eggs and adults of *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* and Luciana Araripe from Fiocruz for critical reading and suggestions on the manuscript. We also thank Benjamin Collier from the Imperial College London for critical reading of the manuscript and comments, that improved the text. This paper is dedicated to the memory of Patrícia Veronica Farnesi Ferreira, Hilda Farnesi Ferreira and Dr. Mario Alberto Cardoso da Silva-Neto, great human beings that will be missed by their families and friends.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

**Formal analysis:** Luana C. Farnesi, Helena C. M. Vargas.

**Funding acquisition:** Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

**Investigation:** Luana C. Farnesi, Helena C. M. Vargas.

**Methodology:** Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

**Project administration:** Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

**Resources:** Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

**Supervision:** Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

**Validation:** Luana C. Farnesi, Gustavo L. Rezende.

**Visualization:** Gustavo L. Rezende.

**Writing – original draft:** Luana C. Farnesi, Helena C. M. Vargas, Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

**Writing – review & editing:** Denise Valle, Gustavo L. Rezende.

## References

1. Christophers SR (1960) *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press.
2. Clements AN (1992) Biology of mosquitoes: Development, nutrition and reproduction. New York: Chapman and Hall. 509 p.
3. Kramer LD, Styer LM, Ebel GD (2008) A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol* 53: 61–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258> PMID: 17645411