

Perfil da expressão gênica de larvas de *Tetrapedia diversipes*  
(Hymenoptera: Apidae) em diapausa

Gene expression profile of diapause larvae of *Tetrapedia diversipes*  
(Hymenoptera: Apidae)

## RESUMO

A diapausa é um fenômeno amplamente presente nos artrópodes e é considerada como primordial para o sucesso evolutivo da Classe Insecta, pois possibilita a sobrevivência em condições adversas, como estações frias e secas. Sabe-se que durante a diapausa ocorre o silenciamento de muitos genes e que outros são unicamente expressos nesta fase. Embora existam evidências de que o processo da diapausa tenha se mantido conservado durante a evolução das espécies, ainda há lacunas no conhecimento sobre o nível de conservação dos padrões metabólicos. Um bom modelo para se estudar a diapausa é *Tetrapedia diversipes*, uma espécie bivoltina de abelha solitária. Os indivíduos que nascem na primeira geração seguem o desenvolvimento desde ovo até adulto em tempo bem menor do que aqueles que nascem na segunda geração; estes retardam o desenvolvimento na fase larval. Além disso, essa espécie é de fácil obtenção no seu ambiente natural, pois apresenta alta taxa de nidificação em ninhos-armadilha. O objetivo deste trabalho foi comparar o perfil de expressão de genes entre as larvas da 1ª geração (que não entram em diapausa), larvas da 2ª geração (que entrariam em diapausa) e das larvas em diapausa. Foram identificados 196 genes diferencialmente expressos, destes 87 foram anotados. Muitos destes genes já foram descritos na literatura como relacionados à diapausa em outras espécies, no entanto, o padrão de expressão não é conservado. Os genes aqui identificados foram divididos em cinco grupos: relacionados à desintoxicação celular, cutícula e citoesqueleto, metabolismo de lipídeos e esteróis, ciclo celular e outros genes relacionados à diapausa.

## ABSTRACT

The diapause is broadly distributed among the arthropods and has had an important role for the evolutionary success of the Class Insecta, mainly because this process permits insects to explore adverse conditions, such as cold and dry seasons. It is known that there are many genes being silenced and others being uniquely expressed during diapause. And although there are evidences that the diapause process has remained conserved during the evolution of species, it is still not clear how conserved are the metabolic patterns involved in this behavior. *Tetrapedia diversipes* is a solitary bee and a good model to study diapause. Individuals from the first generation do not enter in diapause and develop faster than individuals from the second generation, which enter in diapause during the winter. Moreover, this species is easy to capture in natural conditions due to the high rate of nesting in trap nests. The aim of this work was to compare the gene expression profile among non-diapause larvae from first and second generation (about to enter diapause) and larvae already in diapause, through transcriptome data. One hundred ninety-four genes were identified as differentially expressed and 87 of them were annotated. Many of these genes have already been described as related to diapause in others species, but the expression pattern was not conserved. These genes were divided in five groups: related to cellular detoxification, cuticle and cytoskeleton, lipids and steroids metabolism, cell cycle and other genes related to diapause.

# 1. Introdução

## 1.1 A diapausa nos Insetos

Dormência é um termo genérico para o estado de supressão do desenvolvimento, e pode ser classificada em dois tipos: (1) quiescência que é uma resposta imediata a um fator ambiental limitante; e (2) diapausa que é uma via alternativa ao desenvolvimento direto, seu começo geralmente antecede uma condição adversa e o final não necessariamente coincide com o fim da adversidade. O estado de dormência é adaptativo e geralmente acompanhado por redução no metabolismo (Kostál 2006).

O termo diapausa se refere a alterações fisiológicas e comportamentais nos organismos (Fielenbach & Antebi 2008), podendo compreender: (1) parada no desenvolvimento ativo; (2) dormência reprodutiva; (3) redução na taxa de metabolismo; ou (4) a combinação de todos (Emerson *et al.* 2009). Essas alterações ocorrem em resposta a estímulos ambientais que anunciam mudanças sazonais, tais como: restrição alimentar, estresse, mudanças no fotoperíodo ou temperatura (Tauber *et al.* 1986).

A diapausa é um fenômeno amplamente presente nos artrópodes e possibilita que esses organismos sobrevivam durante estações frias e secas. Este processo é considerado como um fator importante para o sucesso evolutivo da Classe Insecta (Denlinger 2002).

Nos insetos a diapausa pode ocorrer nas diversas fases do ciclo de vida: embrião, larva, pupa, adulto farato e adulto (Denlinger 2002). Nos estágios iniciais do ciclo de vida ela é denominada de “diapausa do desenvolvimento” e no adulto de “diapausa reprodutiva” (Wolschin & Gadau 2009). No entanto, em uma mesma espécie, ela é restrita a um desses estágios (Denlinger 2002).

Kostál (2006) divide a diapausa em três fases eco-fisiológicas: pré-diapausa, diapausa e pós-diapausa. Cada fase é regulada pela interação entre fatores endógenos e exógenos.

**Pré-diapausa:** nesta fase os indivíduos ainda estão em desenvolvimento, mas em resposta a um estímulo do ambiente eles se tornam destinados a entrar em diapausa. O estímulo que induz a diapausa é percebido durante um período específico de sensibilidade que é determinado geneticamente (Kostál 2006).

A variação no fotoperíodo é o estímulo natural melhor compreendido (Kostál 2006). É um marcador sazonal em zonas temperadas, mas de efeito reduzido nos

trópicos (Denlinger 1986). Os padrões de temperatura, chuva e fotoperíodo descritos para a área tropical não são forças limitantes, comparáveis ao inverno nas zonas temperadas, para retardar o desenvolvimento de insetos. Na região tropical mudanças na qualidade do alimento podem servir como um estímulo para indução da diapausa (Denlinger 1986).

As mudanças no fotoperíodo têm sido relacionadas com a diapausa em diferentes espécies de Lepidoptera (Xia *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Lu *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013) e Diptera (Emerson *et al.* 2010; Poelchau *et al.* 2011; Vesala *et al.* 2012; Meuti *et al.* 2015). Por outro lado, para espécies de abelhas como *Osmia bicornis* (Hymenoptera) o fotoperíodo não parece ser o estímulo envolvido no início da diapausa, pois o desenvolvimento dos indivíduos (da fase de ovo até a fase adulta) ocorre em um ninho selado e em completa escuridão (Wasielewski *et al.* 2013), mesma situação de desenvolvimento que os indivíduos de *Tetrapedia diversipes* (Hymenoptera) (Alves-dos-Santos *et al.* 2002).

Nesta fase de pré-diapausa, pode ocorrer o sequestro de reservas adicionais de gordura, deposição de camadas extras de hidrocarbonetos para impermeabilização da cutícula ou a síntese de proteínas que permanecem presentes na hemolinfa durante a diapausa (Denlinger 2002). Esta fase é de intensa alimentação e acúmulo de reservas (Kostál 2006).

Os indivíduos que entram ou não em diapausa estocam reservas dos mesmos grupos: lipídeos, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais. Mas na fase de pré-diapausa os triacilgliceróis são a principal reserva estocada, geralmente constituem de 80-95% do conteúdo total de lipídeos (Hahn & Denlinger 2011). A composição de ácidos graxos dos triacilgliceróis pode então diferir qualitativa e quantitativamente entre os indivíduos que entrarão ou não em diapausa, e esta composição é altamente influenciada pela composição de ácidos graxos na dieta do inseto. Os indivíduos que entram em diapausa contêm uma reserva com mais ácidos graxos insaturados, enquanto indivíduos que não entram possuem mais ácidos graxos saturados (Hahn & Denlinger 2011).

As reservas de glicogênio são convertidas em glicose e trealose, que são transportadas para os tecidos e servem como combustíveis para o catabolismo, elas também são metabolizadas para produzir moléculas crioprotetoras que têm como base açúcares ou álcool derivado do açúcar. Glicerol e sorbitol são as moléculas crioprotetoras mais comuns nos insetos (revisito por Hahn & Denlinger, 2011).

Todos estes eventos que ocorrem durante a pré-diapausa refletem no padrão de expressão de genes específicos relacionados à diapausa (Denlinger 2002).

**Diapausa:** esta fase se inicia quando o desenvolvimento direto cessa seguido pela supressão metabólica. Mas, em larvas de vida livre e adultos, que podem se mover, a supressão metabólica é menos profunda e os indivíduos podem continuar ingerindo alimento e estocando energia durante este período (Kostál 2006). O início da diapausa pode ocorrer em diferentes períodos do ano e em diferentes indivíduos de uma mesma população, então cada indivíduo mantém a diapausa por tempo diferente. Mudanças específicas no ambiente estimula a diminuição na intensidade da diapausa e sincroniza os indivíduos de uma mesma população. No fim desta fase, é restabelecido o estado fisiológico em que o desenvolvimento direto pode ser retomado (Kostál 2006).

**Pós-diapausa:** embora as condições biológicas para o desenvolvimento direto já estejam restabelecidas, as condições ambientais ainda não. Sendo assim, os indivíduos permanecem em um estado de quiescência (Kostál 2006). Os insetos nesta fase parecem fisiologicamente idênticos aos indivíduos em diapausa, eles não apresentam mudanças perceptíveis no desenvolvimento, no entanto, a expressão gênica entre estas duas fases é distinta (Denlinger 2002; Poelchau *et al.* 2013c; Yocum *et al.* 2015).

## 1.2 Mecanismos moleculares da diapausa

O início e a progressão da diapausa são mediados por mecanismos moleculares como: diferença na expressão de genes, eventos pós-transcricionais, modificações pós-traducionais das proteínas e localização de proteínas em regiões específicas dentro das células. Identificar as mudanças nesse processo, a sua conservação evolutiva e o seu compartilhamento entre os organismos são questões centrais nos estudos sobre diapausa (MacRae 2010).

Sabe-se que durante este período não há apenas o silenciamento de genes. Alguns são unicamente expressos nesta fase, outros são expressos apenas na fase inicial ou na fase tardia, e outros são expressos com interrupções durante a diapausa. Estas diferenças refletem a complexidade e dinamismo desta fase do desenvolvimento (Denlinger 2002).

Vários mecanismos endócrinos regulam a diapausa, mas precisamente qual hormônio está envolvido depende da espécie e do estágio do desenvolvimento em que ela ocorre. Em *Bombyx mori* (Lepidoptera) a diapausa embrionária é induzida pela ação do hormônio da diapausa (um neuropeptídeo liberado do gânglio subesofágico da fêmea

parental) e é mantida pela elevada quantidade de ecdisteroides (revisado por Denlinger, 2002). O mesmo acontece durante a diapausa da larva farato de primeiro ínstar em *Lymantria dispar* (Lepidoptera), enquanto há uma alta concentração de ecdisteroides, a diapausa persiste e uma redução destes hormônios é necessária para o término da diapausa (Denlinger & Lee 1997).

A função central de ecdisteroides na diapausa de larvas e pupas sugere que os genes associados a esses hormônios podem ser críticos na regulação desse processo. Ao contrário da diapausa no embrião, durante as fases de larva e pupa, há uma falha da glândula protorácica em sintetizar ecdisteroides necessários para promover o desenvolvimento (Denlinger 2002). A falha na glândula protorácica em liberar ecdisona (um hormônio esteroide) impede que a larva passe pelo processo de muda para o próximo ínstar, permanecendo no estágio de diapausa (Denlinger & Armbruster 2014).

A maioria dos casos de diapausa no adulto pode ser atribuída à ausência de hormônio juvenil (HJ). O HJ é produzido pela *corpora allata* (glândula endócrina) dos insetos e atua juntamente com ecdisteroides na regulação da muda, metamorfose e reprodução nos insetos (Denlinger & Armbruster 2014). O bloqueio da produção deste hormônio resulta na interrupção da maturação dos ovos, em glândulas acessórias atrofiadas, na degeneração dos músculos de voo e na parada da atividade de acasalamento. A ativação dessa glândula ocorre no término da diapausa (Denlinger 2002).

Em alguns casos há evidência de efeito materno na regulação da diapausa. A parada do desenvolvimento na fase embrionária é a forma mais comum (Denlinger 1998). Em *B. mori*, anteriormente mencionado, a diapausa do embrião é determinada pela liberação de hormônio da diapausa pela mãe. Outros efeitos maternos são menos diretos e podem determinar a capacidade da larva ou da pupa da próxima geração entrar em diapausa, como acontece em algumas espécies de Hymenoptera e Diptera (revisado por Denlinger, 2002). As sinalizações hormonais, que ocorrem nos diferentes tipos de diapausa, são responsáveis pelos padrões de expressão gênica únicos observados durante esse processo (Denlinger 2002).

As proteínas *heat shock* (HSPs) estão envolvidas com os diferentes tipos de diapausa, desde a dormência de bactérias e fungos à hibernação de mamíferos. Isso sugere que há mecanismos conservados que contribuem para a parada do desenvolvimento (Denlinger 2002). A função dessas proteínas ainda não está bem compreendida. Sabe-se que são chaperonas, cuja função é manter a integridade

estrutural de proteínas durante a dormência ou contribuir com a parada do ciclo celular (Denlinger 2002). Devido à presença de HSPs nos diferentes tipos de diapausa, muitos estudos sobre expressão gênica focaram nestas proteínas (Rinehart *et al.* 2000; Yocum 2001; Denlinger 2002; Yocum *et al.* 2006, 2005; Tachibana *et al.* 2005; Robich *et al.* 2007; Wolschin & Gadau 2009; Zhang & Denlinger 2010; Aruda *et al.* 2011; Gong *et al.* 2013; Lu *et al.* 2013).

Embora estas proteínas estejam presentes em diferentes organismos, não há um padrão conservado na expressão dos genes que as codificam. Por exemplo, sabe-se que a expressão do gene da proteína *heat shock* HSP90 diminui durante a diapausa na pupa de *Sarcophaga crassipalpis* (Diptera) (Rinehart & Denlinger 2000), na larva da vespa *Nasonia vitripennis* (Wolschin & Gadau 2009) e na pupa de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera) (Zhang & Denlinger 2010), no entanto, verificou-se um aumento na sua expressão durante a diapausa da abelha solitária *Megachile rotundata* (Yocum *et al.* 2005) e na pupa de *Delia antiqua* (Diptera) (Chen *et al.* 2005). A expressão de *Hsp70* foi alta durante a diapausa em *S. crassipalpis* (Rinehart *et al.* 2000), em *M. rotundata* (Yocum *et al.* 2005) e na diapausa reprodutiva de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) (Yocum 2001), mas não houve alteração da expressão deste gene na diapausa do adulto em *Culex pipiens* (Diptera) (Rinehart *et al.* 2006), de *Drosophila triauria* (Goto *et al.* 1998), na larva de *Lucilia sericata* (Diptera) (Tachibana *et al.* 2005) e na pupa de *H. zea* (Zhang & Denlinger 2010). O gene *Hsp23* teve sua expressão aumentada em *S. crassipalpis* (Yocum *et al.* 1998) e em *Calliphora vicina* (Diptera) (Fremdt *et al.* 2014), mas não houve alteração em *L. sericata* (Tachibana *et al.* 2005).

Além das proteínas *heat shock*, a via de sinalização da insulina, mais conhecida por regular o metabolismo de carboidrato e gordura em mamíferos, é altamente conservada e uma candidata promissora como reguladora das reservas energéticas durante a diapausa dos insetos (Hahn & Denlinger 2011). Mutações nesta via estão envolvidas com a formação da larva *dauer* (estágio em diapausa) de *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida) (Kimura *et al.* 1997). A formação de larvas *dauer* ocorre quando há condições adversas induzindo a entrada em diapausa (Fielenbach & Antebi 2008). Esta via também está envolvida com o controle da diapausa no adulto de *C. pipiens* (Sim & Denlinger 2008).

Vários genes foram identificados como diferencialmente expressos em estudos de diapausa em diferentes grupos animais e estão envolvidos com o metabolismo energético (Ragland *et al.* 2010; Bao & Xu 2011; Pavlides *et al.* 2011), metabolismo de

lipídeos (Ragland *et al.* 2010; Bao & Xu 2011; Reynolds *et al.* 2012; Poelchau *et al.* 2013b; 2013c), resposta ao estresse (Robich *et al.* 2007; Bao & Xu 2011; Poelchau *et al.* 2011, 2013a; Zhang *et al.* 2013), vias de sinalização (Bao & Xu 2011; Yocum *et al.* 2015), citoesqueleto (Kim *et al.* 2006; Robich *et al.* 2007; Emerson *et al.* 2010; Bryon *et al.* 2013), ciclo celular (Bao & Xu 2011; Yocum *et al.* 2015), formação de cutícula (Emerson *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013; Poelchau *et al.* 2013b), metabolismo de hormônios (Bao & Xu 2011; Poelchau *et al.* 2011, 2013c) e elementos transponíveis (Robich *et al.* 2007; Pavlides *et al.* 2011).

Recentemente, em um estudo sobre a diapausa em *Aedes albopictus* (Diptera) utilizando sequenciamento de nova geração (RNA-Seq), o gene *antígeno nuclear de proliferação celular (pcna)* e o *phosphoenolpyruvate carboxykinase (pepck)* foram sugeridos como parte de um *toolkit* genético da diapausa entre diferentes espécies e estágios. Ambos encontraram-se super expressos na pré-diapausa em *Ae. albopictus* e já haviam sido relacionados com a diapausa em outros organismos (Poelchau *et al.* 2013b).

### 1.3 Diapausa e suas aplicações

Estudos sobre diapausa abordam tanto questões básicas sobre a adaptação dos organismos às heterogeneidades do ambiente, quanto questões mais aplicadas como antecipar respostas biológicas em relação ao contínuo aquecimento global (Poelchau *et al.* 2013c).

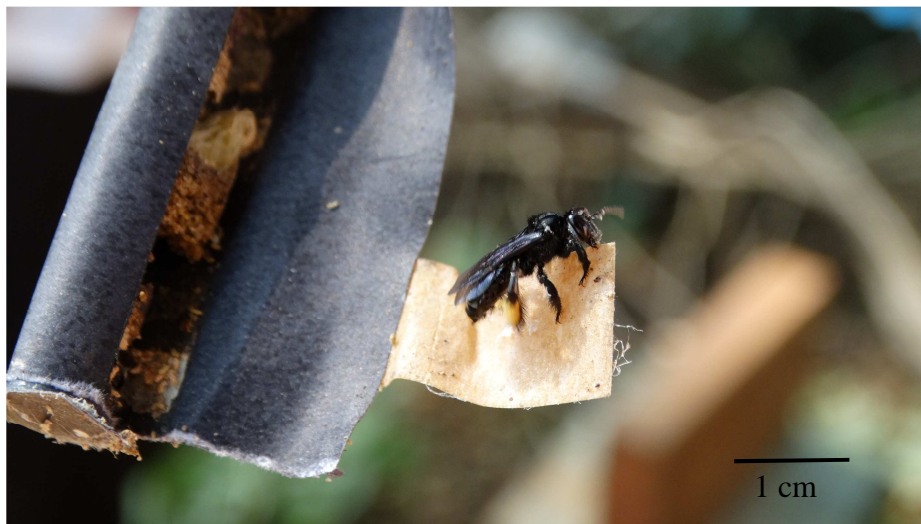
O entendimento detalhado do mecanismo da diapausa pode trazer inúmeras contribuições para: (1) identificação de biomarcadores, pois sabe-se que insetos em diapausa são mais resistentes aos pesticidas, portanto saber quando uma espécie entra em diapausa pode contribuir para a aplicação efetiva de pesticidas (Denlinger 2008); (2) manipulação do desenvolvimento de insetos polinizadores para obtenção de adultos na época das floradas de interesse econômico, por exemplo (Denlinger 2008); (3) desenvolvimento de drogas para bloquear transmissões de doenças virais, pois em insetos, durante esta fase, a replicação viral é interrompida, o que sugere a presença de um mecanismo molecular atuante (Denlinger 2008); (4) incrementar o conhecimento sobre o processo de envelhecimento, pois insetos em diapausa podem viver dez vezes mais que aqueles que não passam por esta fase (Denlinger 2008); (5) desenvolvimento de novos fármacos, pois muitos genes de defesa são altamente expressos durante a diapausa para evitar infecções. Os *alloferons* (peptídeos antimicrobianos), por exemplo,



foram isolados da larva em diapausa de *C. vicina* e mostraram atividades antiviral e antitumoral em camundongos (Chernysh *et al.* 2002); (6) entender questões básicas relacionadas ao estoque e utilização de energia, pois muitos insetos acumulam gordura na pré-diapausa e entender como esta mudança fisiológica ocorre pode contribuir para a saúde humana (ex. obesidade e diabetes) (Hahn & Denlinger 2011); e (7) desenvolvimento de estratégias de armazenamento de tecidos para transplantes de órgãos humanos, pois a capacidade de diminuir o metabolismo é uma característica impressionante que ocorre durante a diapausa (Hahn & Denlinger 2011).

#### 1.4 *Tetrapedia diversipes* e a diapausa

Os gêneros *Tetrapedia* e *Coelioxoides* compreendem abelhas solitárias e juntos compõem a tribo Tetrapediini (Michener 2007). As espécies *T. diversipes* (Figura 1) e *Coelioxoides waltheriae* já foram amplamente estudadas em relação ao desenvolvimento e comportamento de nidificação (Alves-dos-Santos *et al.* 2002). Naturalmente, *T. diversipes* nidifica em cavidades de troncos previamente utilizados por besouros, podendo também nidificar em ninhos-armadilha. Os ninhos consistem de células separadas umas das outras por uma camada de grãos finos de areia misturados a óleo, e uma massa de pólen misturada a óleo ocupando toda a célula, sendo o ovo colocado no alimento. O desenvolvimento de *T. diversipes* consiste de cinco instares larvais, pupa e adulto (Alves-dos-Santos *et al.* 2002).

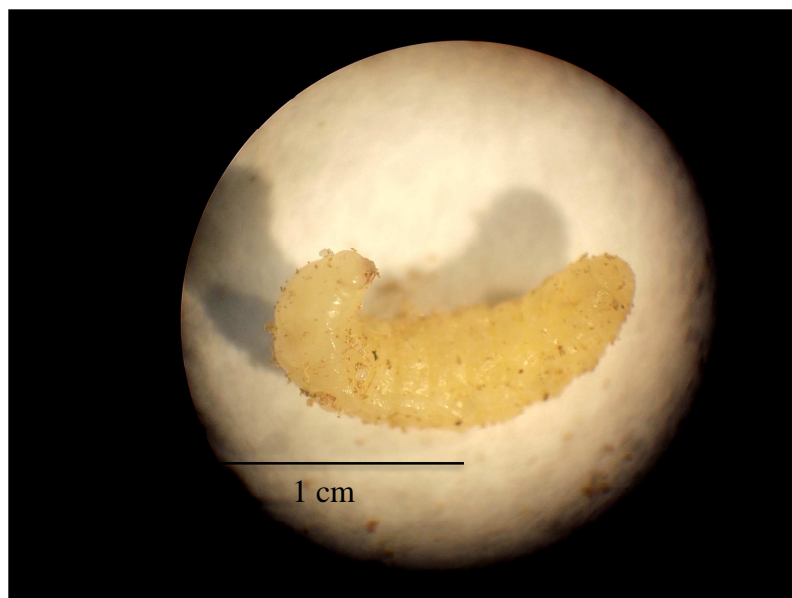


**Figura 1:** Indivíduo adulto de *Tetrapedia diversipes* recém-emergido (Foto por Natália Araujo).

Cada ninho é construído por uma única fêmea e pode ser constituído por um número diferente de células, variando de uma a sete. É comum o reuso dos ninhos

antigos pelas gerações subsequentes, a nova fêmea limpa o orifício removendo as fezes antigas e o material arenoso e começa a construção do novo ninho. Ocasionalmente foram observados ninhos abandonados antes de estarem completos (quando a fêmea morre durante o forrageamento, por exemplo), nestes casos eles foram ocupados por outra fêmea alguns dias depois. Nestas ocasiões, em um mesmo ninho, há imaturos em duas fases sequenciais de desenvolvimento, provenientes de duas fêmeas distintas (Alves-dos-Santos *et al.* 2002).

A espécie *T. diversipes* é um modelo interessante para se estudar o fenômeno da diapausa, pois apresenta duas gerações anuais (bivoltina) sendo que uma entra em diapausa e a outra não. Os indivíduos que nascem na primeira geração (ninhos fundados na primavera), e não entram em diapausa, têm o desenvolvimento mais acelerado em relação aos indivíduos da segunda geração (ninhos fundados no final do verão e no outono), que entram em diapausa. Foi observado que o tempo de desenvolvimento em *T. diversipes* varia de 21 a 366 dias. Essa grande variação no tempo indica um período de diapausa principalmente para os indivíduos de ninhos fundados no final do verão e no outono (Cordeiro 2009). Nos meses mais frios e secos (junho a agosto) o desenvolvimento cessa na fase de larva madura (estágio larval que precede a formação da pupa, também chamado 5º ínstar larval) (Figura 2).



**Figura 2:** Larva no 5º ínstar de *Tetrapedia diversipes* (Foto por Natália Araujo).

A maioria dos trabalhos focando o fenômeno da diapausa em insetos analisou a expressão de genes em espécies de clima temperado, e mantidas sob condições de

laboratório. *Tetrapedia diversipes* é uma espécie tropical que possui dois modos de desenvolvimento ao longo do ano, o que permite analisar o perfil de expressão de genes de amostras coletadas diretamente na natureza, sem a necessidade de manipulação das condições externas para indução da diapausa. O padrão de expressão gênica dessa espécie será importante para estudos comparativos com outras espécies de insetos que também entram em diapausa. Ainda, poderá fornecer evidências evolutivas sobre as vias metabólicas e redes de interação gênica conservadas, ou não, entre organismos filogeneticamente mais relacionados, como outros Hymenoptera.

## **2. Conclusão**

Este trabalho foi o primeiro a gerar informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na diapausa em *T. diversipes*, além de ser um dos poucos trabalhos em que indivíduos, de uma espécie tropical, em condições naturais foram utilizados para essa abordagem. Foi possível notar a expressão diferencial entre larvas de *T. diversipes* em não diapausa e diapausa. No entanto, poucos genes foram anotados, isso se deve à ausência de um genoma de referência de um organismo filogeneticamente próximo. Para otimizar os resultados e descrever um cenário mais completo sobre a diapausa em *T. diversipes*, um genoma de referência desta espécie será gerado em continuação a esse estudo. Um genoma de referência da mesma espécie contribuirá para melhor montagem dos transcritos e conseqüentemente melhor anotação dos mesmos com bancos de dados.

Os genes que foram anotados estão principalmente relacionados ao metabolismo de esteróis, lipídeos, citoesqueleto, cutícula e ciclo celular. Os genes não identificados podem ser genes novos que são interessantes não apenas para entender a diapausa, mas também os mecanismos moleculares fundamentais conservados entre diferentes grupos e assim contribuir com questões mais amplas sobre obesidade, envelhecimento e estudos farmacológicos como sugerido por Denlinger em 2008.

### 3. Referências Bibliográficas

- Alves-dos-Santos I, Melo GAR, Rozen JR JG (2002) Biology and Immature Stages of the Bee Tribe Tetrapediini (Hymenoptera : Apidae). *American Museum of Natural History*, 45.
- Aruda AM, Baumgartner MF, Reitzel AM, Tarrant AM (2011) Heat shock protein expression during stress and diapause in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *Journal of Insect Physiology*, **57**, 665–75.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, **25**, 25–29.
- Bao B, Xu W-H (2011) Identification of gene expression changes associated with the initiation of diapause in the brain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC genomics*, **12**, 224.
- Berthold J, Schenková K, Rivero F (2008) Rho GTPases of the RhoBTB subfamily and tumorigenesis. *Acta Pharmacologica Sinica*, **29**, 285–295.
- Brown CT, Howe A, Zhang Q, Pyrkosz AB, Brom TH (2012) A Reference-Free Algorithm for Computational Normalization of Shotgun Sequencing Data. , 1–18.
- Bryon A, Wybouw N, Dermauw W, Tirry L, Van Leeuwen T (2013) Genome wide gene-expression analysis of facultative reproductive diapause in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics*, **14**, 815.
- Burnell AM, Houthoofd K, O’Hanlon K, Vanfleteren JR (2005) Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, **40**, 850–856.
- Cardinal S, Straka J, Danforth BN (2010) Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 16207–11.
- Carrasco MA, Buechler SA, Arnold RJ *et al.* (2011) Elucidating the Biochemical Overwintering Adaptations of Larval *Cucujus clavipes puniceus* , a Nonmodel

Organism , via High Throughput Proteomics. *Journal of Proteome Research*, **10**, 4634–4646.

Charles JP (2010) The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **40**, 205–213.

Chen B, Kayukawa T, Monteiro A, Ishikawa Y (2005) The expression of the *HSP90* gene in response to winter and summer diapause and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Molecular Biology*, **14**, 697–702.

Chernysh S, Kim SI, Pleskach VA *et al.* (2002) Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 12628–12632.

Ching T, Huang S, Garmire LX (2014) Power analysis and sample size estimation for RNA-Seq differential expression. *RNA*, **20**, 1-3.

Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM (2010) The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, **38**, 1767–1771.

Colgan TJ, Carolan JC, Bridgett SJ *et al.* (2011) Polyphenism in social insects: insights from a transcriptome-wide analysis of gene expression in the life stages of the key pollinator, *Bombus terrestris*. *BMC genomics*, **12**, 623.

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM *et al.* (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **21**, 3674–6.

Corbeil D, Ro K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB (2001) Prominin : A Story of Cholesterol, Plasma Membrane Protrusions and Human Pathology. *Traffic*, **2**, 82–91.

Cordeiro GD (2009) Abelhas solitárias nidificantes em ninhos-armadilha em quatro áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Universidade de São Paulo.

- Denlinger DL (1986) Dormancy in tropical insects. *Annual Review of Entomology*, **31**, 239–264.
- Denlinger DL (1998) Maternal control of fly diapause. In: *Maternal Effects as Adaptations* (eds Mousseau TA, Fox CW), pp. 275–287. Oxford University Press, New York.
- Denlinger DL (2002) Regulation of Diapause. *Annual Review of Entomology*, **47**, 93–122.
- Denlinger DL (2008) Why study diapause? *Entomological Research*, **38**, 1–9.
- Denlinger DL, Armbruster P a (2014) Mosquito diapause. *Annual review of entomology*, **59**, 73–93.
- Denlinger DL, Lee K-Y (1997) A Role for Ecdysteroids in the Induction and Maintenance of the Pharate First Instar Diapause of the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. *Journal of Insect Physiology*, **43**, 289–296.
- Denlinger DL, Michaud MR (2010) Genomics, proteomics and metabolomics: Finding the other players in insect cold-tolerance. In: *Low Temperature Biology of Insects* (eds Denlinger DL, Lee Jr RE), pp. 91–115. Cambridge University Press, New York.
- Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R (2006) Evolution of the Yellow / Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, **16**, 1385–1394.
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S *et al.* (2010) Geneious v5.1.
- Elsik CG, Worley KC, Bennett AK *et al.* (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*, **15**, 86.
- Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM (2009) Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. *Trends in genetics*, **25**, 217–225.

- Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM (2010) Microarrays reveal early transcriptional events during the termination of larval diapause in natural populations of the mosquito, *Wyeomyia smithii*. *PLoS ONE*, **5**.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629–635.
- FASTX-Toolkit (2010)
- Fielenbach N, Antebi A (2008) *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & Development*, **22**, 2149–65.
- Fischman BJ (2013) Mechanisms involved in eusocial evolution in bees. University of Illinois.
- Fluegel ML, Parker TJ, Pallanck LJ (2005) Mutations of a drosophila NPC1 gene confer sterol and ecdysone metabolic defects. *Genetics Society of America*, **172**, 185–196.
- Françoso E, Arias MC (2013) *Cytochrome c oxidase I* primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. *Molecular Ecology Resources*, **13**, 844–850.
- Fremdt H, Amendt J, Zehner R (2014) Diapause-specific gene expression in *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae)--a useful diagnostic tool for forensic entomology. *International Journal of Legal Medicine*, **128**, 1001–11.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W (2012) CD-HIT : accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, **28**, 3150–2.
- García-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J *et al.* (2012) Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **28**, 2678–9.
- Gerisch B, Antebi A (2004) Hormonal signals produced by DAF-9/cytochrome P450 regulate *C. elegans* dauer diapause in response to environmental cues. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 1765–76.

- Gong Z-J, Wu Y-Q, Miao J *et al.* (2013) Global transcriptome analysis of orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) to identify candidate transcripts regulating diapause. *PLoS one*, **8**, e71564.
- Goto SG, Yoshida KM, Kimura MT (1998) Accumulation of *Hsp70* mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 1009–1015.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M *et al.* (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, **29**, 644–652.
- Hahn DA, Denlinger DL (2011) Energetics of insect diapause. *Annual review of entomology*, **56**, 103–121.
- Hamaguchi M, Meth JL, von Klitzing C *et al.* (2002) DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13647–13652.
- Hansen KD, Brenner SE, Dudoit S (2010) Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic acids research*, **38**, e131.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, **52**, 269–279.
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, **8**, 67–113.
- Hofer S, Homberg U (2006) Evidence for a role of orcokinin-related peptides in the circadian clock controlling locomotor activity of the cockroach *Leucophaea maderae*. *The Journal of Experimental Biology*, **209**, 2794–2803.
- Hunt JH, Amdam GV (2005) Bivoltinism as an antecedent to eusociality in the paper wasp genus *Polistes*. *Science*, **308**, 264–267.



- Jiang H, Kim HG, Park Y (2015) Alternatively spliced orcokinin isoforms and their functions in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **65**, 1–9.
- Josephy PD (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Josephy Human Genomics and Proteomics*, **2010**, 1–14.
- Jovanović-Galović A, Blagojević DP, Grubor-Lajsić G, Worland MR, Spasić MB (2007) Antioxidant Defense in Mitochondria During Diapause and Postdiapause Development of European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **64**, 111–119.
- Kim M, Robich RM, Rinehart JP, Denlinger DL (2006) Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *Journal of Insect Physiology*, **52**, 1226–1233.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997) daf-2, an Insulin Receptor – Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **277**, 942–946.
- Kostál V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, **52**, 113–27.
- Koštál V, Šimůnková P, Kobelková A, Shimada K (2009) Cell cycle arrest as a hallmark of insect diapause: Changes in gene transcription during diapause induction in the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**, 875–883.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science (New York, N.Y.)*, **319**, 1827–1830.
- Kuroyanagi H (2009) Fox-1 family of RNA-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**, 3895–3907.

- Lander ES, Linton LM, Birren B *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860–921.
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, **9**, 357–359.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann JA (1996) The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *Spatzle / Toll / cactus* Controls the spa Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, **86**, 973–983.
- Li J, Brown G, Ailion M, Lee S, Thomas JH (2004) NCR-1 and NCR-2, the *C. elegans* homologs of the human Niemann-Pick type C1 disease protein, function upstream of DAF-9 in the dauer formation pathways. *Development*, **131**, 5741–5752.
- Li A, Denlinger DL (2009) Pupal Cuticle Protein is Abundant During Early Adult Diapause in the Mosquito *Culex pipiens* Pupal Cuticle Protein Is Abundant During Early Adult Diapause in the Mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Medical Entomology*, **46**, 1382–1386.
- Li B, Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, **12**, 323.
- Liu M, Zhang T-Y, Xu W-H (2005) A cDNA encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein in *Helicoverpa armigera*: molecular characterization and expression analysis associated with pupal diapause. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **141**, 168–176.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.
- Lowry JA, Atchley WR (2000) Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *Journal of Molecular Evolution*, **50**, 103–115.
- Lu M-X, Cao S-S, Du Y-Z *et al.* (2013) Diapause, signal and molecular characteristics of overwintering *Chilo suppressalis* (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Scientific Reports*, **3**, 3211.

- Machado C, Andrew DJ (2000) D-Titin: A giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *Journal of Cell Biology*, **151**, 639–651.
- MacRae TH (2010) Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cellular and molecular life sciences*, **67**, 2405–24.
- Mao H, Zhang L, Yang Y *et al.* (2011) RhoBTB2 (DBC2) functions as tumor suppressor via inhibiting proliferation, preventing colony formation and inducing apoptosis in breast cancer cells. *Gene*, **486**, 74–80.
- Martini M, Gnann A, Scheikl D, Holzmann B, Janssen KP (2011) The candidate tumor suppressor *SASH1* interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **43**, 1630–1640.
- McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thomas JH, Gems D (2004) Shared Transcriptional Signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer Larvae and Long-lived *daf-2* Mutants Implicates Detoxification System in Longevity Assurance. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 44533–43.
- Meller CL, Meller R, Simon RP, Culpepper KM, Podrabsky JE (2012) Cell cycle arrest associated with anoxia-induced quiescence, anoxic preconditioning, and embryonic diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Journal of Comparative Physiology B*, **182**, 909–920.
- Meuti ME, Stone M, Ikeno T, Denlinger DL (2015) Functional circadian clock genes are essential for the overwintering diapause of the Northern house mosquito, *Culex pipiens*. *The Journal of Experimental Biology*, **218**, 412–22.
- Michener CD (2007) *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Musacchia F, Basu S, Petrosino G, Salvemini M, Sanges R (2015) Annocript: a flexible pipeline for the annotation of transcriptomes able to identify putative long noncoding RNAs. *Bioinformatics*, **31**, 2199–2201.

- Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, Yaginuma T (1991) Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G2-arrest at diapause stage. *Roux's Archives of Developmental Biology*, **200**, 223–229.
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2005) *Lehninger principles of biochemistry*. W.H. Freeman, New York.
- Pavlidis SC, Pavlidis SA, Tammariello SP (2011) Proteomic and phosphoproteomic profiling during diapause entrance in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, **57**, 635–44.
- Podrabsky JE, Culpepper KM (2012) Cell cycle regulation during development and dormancy in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Cell Cycle*, **11**, 1697–1704.
- Poelchau MF, Reynolds JA, Denlinger DL, Elsik CG, Armbruster PA (2011) A de novo transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation. *BMC Genomics*, **12**, 619.
- Poelchau MF, Reynolds JA, Denlinger DL, Elsik CG, Armbruster PA (2013a) Transcriptome sequencing as a platform to elucidate molecular components of the diapause response in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Physiological Entomology*, **38**, 173–181.
- Poelchau MF, Reynolds JA, Elsik CG, Denlinger DL, Armbruster PA (2013b) Deep sequencing reveals complex mechanisms of diapause preparation in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**, 20130143.
- Poelchau MF, Reynolds JA, Elsik CG, Denlinger DL, Armbruster PA (2013c) RNA-Seq reveals early distinctions and late convergence of gene expression between diapause and quiescence in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *The Journal of experimental biology*, **216**, 4082–90.
- Pohl A, Devaux PF, Herrmann A (2004) Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1733**, 29–52.

- Poupardin R, Schöttner K, Korbelová J *et al.* (2015) Early transcriptional events linked to induction of diapause revealed by RNAseq in larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *BMC Genomics*, **16**, 720.
- Ragland GJ, Denlinger DL, Hahn DA (2010) Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 14909–14.
- Ramírez SR, Nieh JC, Quental TB *et al.* (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **56**, 519–25.
- Reynolds JA, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA, Denlinger DL (2012) Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 966–73.
- Ribeiro I, Marcão A, Amaral O *et al.* (2001) Niemann-Pick type C disease: *NPC1* mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Human Genetics*, **109**, 24–32.
- Rinehart JP, Denlinger DL (2000) Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, **9**, 641–645.
- Rinehart JP, Robich RM, Denlinger DL (2006) Enhanced Cold and Desiccation Tolerance in Diapausing Adults of *Culex pipiens*, and a Role for *Hsp70* in Response to Cold Shock but Not as a Component of the Diapause Program. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 713–722.
- Rinehart J, Yocum G, Denlinger D (2000) Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **30**, 515–521.

- Robich RM, Rinehart JP, Kitchen LJ, Denlinger DL (2007) Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization. *Journal of Insect Physiology*, **53**, 235–245.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **26**, 139–40.
- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E (2012) Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **28**, 1086–92.
- Sim C, Denlinger DL (2008) Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 6777–6781.
- Sim C, Denlinger DL (2009) Transcription profiling and regulation of fat metabolism genes in diapausing adults of the mosquito *Culex pipiens*. *Physiological Genomics*, **39**, 202–209.
- Simao FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 1–3.
- Siripurapu V, Meth J, Kobayashi N, Hamaguchi M (2005) DBC2 significantly influences cell-cycle, apoptosis, cytoskeleton and membrane-trafficking pathways. *Journal of Molecular Biology*, **346**, 83–89.
- Sym M, Basson M, Johnson C (2000) A model for Niemann–Pick type C disease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, **10**, 527–530.
- Tachibana S-I, Numata H, Goto SG (2005) Gene expression of heat-shock proteins (*Hsp23*, *Hsp70* and *Hsp90*) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. *Journal of Insect Physiology*, **51**, 641–647.
- Tammariello SP, Denlinger DL (1998) G0/G1 cell cycle arrest in the brain of *Sarcophaga crassipalpis* during pupal diapause and the expression pattern of the

- cell cycle regulator, proliferating cell nuclear antigen. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**, 83–89.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S (1986) *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York.
- Uno T, Nakasuji A, Shimoda M, Aizono Y (2004) Expression of cytochrome c oxidase subunit I gene in the brain at an early stage in the termination of pupal diapause in the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*. *Journal of Insect Physiology*, **50**, 35–42.
- Vesala L, Salminen TS, Kankare M, Hoikkala A (2012) Photoperiodic regulation of cold tolerance and expression levels of regucalcin gene in *Drosophila montana*. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 704–709.
- Wang J, Kim SK (2003) Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, **130**, 1621–1634.
- Wang X-P, Yang Q-S, Dalin P *et al.* (2012) Geographic variation in photoperiodic diapause induction and diapause intensity in *Sericanus montelus* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Science*, **19**, 295–302.
- Wang C-J, Yang D, Luo Y-W (2015) RhoBTB2 ( DBC2 ) functions as a multifunctional tumor suppressor in thyroid cancer cells via mitochondrial apoptotic pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 5954–5958.
- Wasielowski O, Wojciechowicz T, Giejdasz K, Krishnan N (2013) Overwintering strategies in the red mason solitary bee - Physiological correlates of midgut metabolic activity and turnover of nutrient reserves in females of *Osmia bicornis*. *Apidologie*, **44**, 642–656.
- Wolschin F, Gadau J (2009) Deciphering proteomic signatures of early diapause in *Nasonia*. *PloS one*, **4**.

- Xia Q-W, Chen C, Tu X-Y, Yang H-Z, Xue F-S (2012) Inheritance of photoperiodic induction of larval diapause in the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Physiological Entomology*, **37**, 185–191.
- Yamanaka N, Roller L, Zitňan D *et al.* (2011) Bombyx orckinins are brain-gut peptides involved in the neuronal regulation of ecdysteroidogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, **519**, 238–46.
- Yang L, Liu M, Gu Z *et al.* (2012) Overexpression of SASH1 related to the decreased invasion ability of human glioma U251 cells. *Tumor Biology*, **33**, 2225–2263.
- Yang J, Zhu J, Xu W-H (2010) Differential expression, phosphorylation of COX subunit 1 and COX activity during diapause phase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, **56**, 1992–1998.
- Yocum GD (2001) Differential expression of two *HSP70* transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 1139–1145.
- Yocum GD, Joplin KH, Denlinger DL (1998) Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**, 677–682.
- Yocum GD, Kemp WP, Bosch J, Knoblett JN (2005) Temporal variation in overwintering gene expression and respiration in the solitary bee *Megachile rotundata*. *Journal of Insect Physiology*, **51**, 621–629.
- Yocum GD, Kemp WP, Bosch J, Knoblett JN (2006) Thermal history influences diapause development in the solitary bee *Megachile rotundata*. *Journal of Insect Physiology*, **52**, 1113–20.
- Yocum GD, Rinehart JP, Horvath DP *et al.* (2015) Key molecular processes of the diapause to post-diapause quiescence transition in the alfalfa leafcutting bee *Megachile rotundata* identified by comparative transcriptome analysis. *Physiological Entomology*, n/a–n/a.



Yoshihara T, Collado D, Hamaguchi M (2007) Cyclin D1 Down-regulation is Essential for DBC2's Tumor Suppressor Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358**, 1076–1079.

Zhang Q, Denlinger DL (2010) Molecular characterization of heat shock protein 90, 70 and 70 cognate cDNAs and their expression patterns during thermal stress and pupal diapause in the corn earworm. *Journal of Insect Physiology*, **56**, 138–150.

Zhang Q, Lu Y-X, Xu W-H (2013) Proteomic and metabolomic profiles of larval hemolymph associated with diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC genomics*, **14**, 751.

Zhbannikov IY (2013) SeqYclean.