

SNPs 分子标记技术在昆虫学研究中的应用*

董 辉** 钱海涛 柳晓利 丛 斌***

(沈阳农业大学植物保护学院 害虫生物防治研究 沈阳 110866)

摘 要 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)主要是指在染色体基因组水平上由于单个核苷酸的变异而引起的 DNA 序列多态性,包括单碱基的转换或颠换引起的点突变,其中最少出现 1 种等位基因频率不小于 1%,常以双等位基因的形式出现,稳定而可靠。在目前的昆虫基因组研究中,SNPs 标记的研究主要集中在果蝇、蚊媒、家蚕等一些模式生物。本文对 SNPs 标记在昆虫的种类鉴定、遗传图谱构建、种群遗传学、抗药性分子机理等方面进行了综述,最后展望了 SNPs 在种群遗传、标记辅助选择和生物进化等研究领域中的应用前景。

关键词 单核苷酸多态性,昆虫学,DNA,遗传标记

Applications of SNPs molecular markers in Entomology

DONG Hui** QIAN Hai-Tao LIU Xiao-Li CONG Bin***

(Laboratory for Bio-Control of Pest Insects, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract Single nucleotide polymorphisms (SNPs) mainly refer to sequence polymorphism in DNA caused by a single nucleotide variation at the genomic level. These include point mutations caused by single base transversions or conversions in which the frequency of one kind of allele is not less than 1%. Stable and reliable SNPs often involve two alleles. The use of SNPs markers in current research on insect genomes is still mainly restricted to a few model organisms; for example, the fruit fly, mosquito and silkworm. This paper summarizes the types of SNPs markers useful in entomological research, including taxonomy, genetic map construction, population genetics and elucidating molecular mechanisms of pesticide resistance. Future prospects for the application of SNPs in fields such as population genetics, marker-assisted selection and evolution are discussed.

Key words single nucleotide polymorphisms, insectology, DNA, genetic markers

分子标记是继形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来的一种新的遗传标记形式。由于分子标记直接以 DNA 的形式表现,不受环境条件和发育阶段的影响,且标记的数目多,多态性高,其研究与应用已得到了迅猛的发展,相继出现了 20 多种 DNA 分子标记方法。1996 年,美国麻省理工学院人类基因组研究中心的 Lander(1996)第一次提出单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)可以作为新一代的分子标记。目前,该标记已经成为继限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,

RFLP)和微卫星标记(simple sequence repeats, SSR)之后最有前途的第三代分子标记,正在农业、生物学、医学等众多学科发挥着巨大作用。近年来,伴随着昆虫 DNA 序列数据增加和 51 种昆虫全基因组测序计划的完成或部分完成(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>),DNA 序列数据库海量递增,为我们研究单个核苷酸水平的变异提供了前所未有的机遇(Black and Vontas 2007)。本文对 SNPs 标记在昆虫的种类鉴定、遗传图谱构建、种群遗传学、抗药性分子机理等方面进行了综述。

* 资助项目:国家自然科学基金(30871674, 30971962)、国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD0806-01)、辽宁省高校重点实验室支持计划项目(2008S203)、辽宁省教育厅科研项目(L2010488)、沈阳农业大学教师科研基金(20091012)。

** E-mail: biocontrol@163.com

*** 通讯作者, E-mail: bin1956@163.com

收稿日期:2010-07-04, 接受日期:2010-09-13

1 SNPs 标记在昆虫种类和生物型鉴定中的应用

DNA 作为遗传载体,信息含量大,在不同种类或生物型内具有高度的遗传稳定性,且不受外界环境因素和生物发育阶段及器官组织差异的影响,因此用 SNPs 标记进行昆虫种类和生物型鉴定,尤其是对昆虫近缘种的鉴别非常有效。

伊蚊属、按蚊属、库蚊属内各蚊种形态相似,但在生理、生态习性、媒介效能和对化学杀虫剂的敏感性等方面均存在一定的差异,快速而准确地对蚊种、种团、复合体的鉴别是蚊媒和蚊媒病防治的关键。Scott 等(1993)以 PCR 为基础的,建立了利用特异性引物区分冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, 阿拉伯按蚊 *A. arabiensis*, *A. quadrimaculatus* 和 *A. melas* 4 个种,3 个 *A. melas* 地理种群间存在单碱基差异的鉴定方法。Bourguet 等(1998)利用 *ScaI* 内切酶酶切发现在 *Culex pipiens* 和 *C. quinquefasciatus* 的乙酰胆碱酯酶基因第二外显子上的 SNPs 数量存在差异,并根据 SNPs 位点数量的变化,利用等位基因特异性 PCR 成功鉴定出世界范围内的 30 个自然种群的库蚊姐妹种。上述两种 SNPs 的鉴别方法的不足之处在于 PCR 扩增条件复杂、准确性差、易产生假阳性(Wilkins *et al.*, 2006)。因此,将上游引物设定为通用引物,在下游引物 3'末端倒数第 3 位引入一个人为错配的碱基,并将下游引物的最后一个碱基与按蚊的 SNPs 位点相同,成功地鉴定出上述 4 种按蚊复合体。同前两种方法相比既增加了反应的特异性扩增,也不需要限制性内切酶识别位点,同时免去了限制性内切酶的酶切检测过程,只需一次 PCR 反应即可检测出变异位点的两个等位基因,是一个快速、方便和费用低的 SNPs 检测方法。

近年来,在 PCR 技术基础上发展起来的一种基于 TaqMan 探针的高度灵敏、高通量检测单核苷酸多态性的方法也被用于昆虫的鉴定。在冈比亚按蚊和阿拉伯按蚊的鉴定中,其反应的特异性和灵敏性上均超过常规 PCR 方法(Walker *et al.*, 2007),该方法甚至可以检测单个新鲜的或者用二氧化硅干燥的足(Bass *et al.*, 2007)。但上述方法由于只是采用单个探针,在反应的成功率、鉴定的准确率以及鉴定种类的数量上仍有不足之处。为了克服上述缺陷,Bass 等(2008)利用制备的三重

荧光探针,建立的单核苷酸多态性基因分型方法可以同时鉴定出传播疟疾的两种按蚊及其姊妹种,并运用该方法对撒哈拉南部非洲 13 个国家收集的 450 头按蚊进行分析,证明该多重荧光定量方法具有更高的反应特异性和灵敏性。

此外,SNPs 标记和其它种类分子标记相结合,在昆虫生物型判断中也有一定的应用。金小蜂属寄生蜂作为双翅目蝇类的蛹期特异性寄生蜂,对蝇类有很好的控制作用,是蝇类重要的生物防治种类。由于金小蜂属种类个体微小,难以从形态学进行准确地区分,也缺少准确可靠的分子标记技术。Niehuis 等(2007)利用 EST 数据库,开发出了快速准确鉴定丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 和 *N. giraulti* 及其混合种的 8 个 SNPs 标记和 3 个 STS 标记,为金小蜂属经济性状相关基因的 QTL 作图奠定了基础。

B 型和 Q 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* 抗药性强,两种生物型全球分布,快速、准确的生物型鉴定方法是其防治的关键。Jones 等(2008)利用提交到 GeneBank 中的 B 型和 Q 型烟粉虱线粒体 CO I 序列进行比对鉴定出的 SNPs,建立了利用荧光染料探针标记的实时荧光定量 PCR 方法,成功地将烟粉虱的两种生物型分开,并对世界不同地区已知生物型的 72 头烟粉虱进行验证,鉴定准确率为 100%。这种快速高通量的鉴定方法对 B 型和 Q 型烟粉虱的抗药性监测、综合治理以及确定入侵害虫的起源地具有重要意义。

2 SNPs 标记在昆虫遗传图谱构建中的应用

基因组作图是基因组学和功能基因组学研究的重要内容,是基因图位克隆和基因结构与功能研究的基础。SNPs 作为脊椎动物和无脊椎动物基因组中最常见,最丰富的 DNA 序列变异形式,随着高通量检测技术的发展,极大地促进了该标记的开发。该标记最具吸引力的方面就是利用群体遗传学中的连锁不平衡原理来进行高密度图谱的构建和进行关联分析。

黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 作为遗传研究的模式生物,构建高密度的分子遗传图谱是定位候选基因的保障。Teeter 等(2000)首次利用比较基因序列(大量的基因片段和 STS 序列)分析方法建立了一个低分辨率的黑腹果蝇基因组的 SNPs

物理图谱,此后不久,大量的 STS 序列被测序,为黑腹果蝇开发出一张贯穿整个基因组的高密度的 SNPs 图谱(Hoskins *et al.* 2001),该图谱共鉴定出 474 个双等位基因 SNPs 标记定位于果蝇染色体,其中常染色体上 225 kb 内存在 1 个新标记,性染色体每百万 kb 内存在一个新标记。此后,又有 52 个 SNPs 标记被定位在性染色体上,138 个 SNPs 标记被定位在 2 号染色体上,其中有 73 个 SNPs 标记被定位在 3 号染色体的右臂上(3R)(Martin *et al.* 2001)。随后又有 89 个 SNPs 标记被定位在 3 号染色体上(Behura 2006)。然而,这些图谱的分辨率仍然相对较低,在很多情况下还不足以定位某些候选基因。最近,Chen 等(2008)利用 TAMS(tag-array mini-sequencing)检测技术,在实验室普通黑腹果蝇品系上发现 27 367 个 SNPs,并制作了一个分辨率高达 50.3 kb 遗传图谱,平均 6.3 个基因一个 SNPs,这个新的图谱为果蝇新的主效基因的发现、定位和克隆打下了良好的基础,同时也为其他昆虫遗传图谱的开发提供了借鉴。

在许多物种中发现、收集与鉴定的 SNPs 已经构成了庞大的序列变异数据库,这些工作将会极大地促进遗传图谱的构建。Fulton 等(2001)利用 SSCP 筛选 94 个埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 cDNA 克隆,建立了一个总长度 134 cM,标记间平均距离为 2 cM 的连锁图谱。Holt 等(2002)的研究表明,在冈比亚按蚊长达 2.78×10^8 bp 的基因组序列中有 40 万个 SNPs,之后密度增加到 12 个 SNPs/kb,转换与颠换比例为 2:1,核苷酸多样性与碱基替换成正相关(Morlais and Severson 2003),揭示了冈比亚按蚊基因组 DNA 存在广泛的多态性。Wondji 等(2007)鉴定了致死按蚊 *A. funestus* 50 个基因中 494 个 SNPs 标记,其中 303 个 SNPs 标记位于基因的编码区,转换与颠换的比率约为 2:1,平均密度为 7 个 SNPs/kb。在之后的埃及伊蚊基因内的平均密度达到了 12 个 SNPs/kb(Urdaneta-Marquez *et al.* 2008),该图谱的密度与冈比亚按蚊和黑腹果蝇的接近,使得蚊类遗传图谱的精度得到进一步提高。

用 SNPs 标记还有助于将遗传图谱和物理图谱进行进一步的整合(Rafalski 2002)。物理图谱通常是由 BAC 克隆的重叠群组成,这样可以通过检测 BAC 末端的重复序列来发现 SNPs,然后再将这些来自 BAC 末端的 SNPs 标记进行遗传作图,

从而达到将遗传图谱和物理图谱进行整合的目的。Yamamoto 等(2006)首次利用 BAC 末端序列开发出家蚕 *Bombyx mori* P50T 和 C108T 两个品种的 534 个 SNPs 标记,建立了一个总长度 1 305 cM,覆盖家蚕的全部 28 个连锁群,标记间平均距离 2.5 cM 的连锁图谱,使得家蚕基因组图谱分辨率达到 1.3 个 SNPs/kb,该图谱几乎是先前报道的 2 倍(Cheng *et al.* 2004)。Yamamoto 等(2008)又在原图的基础上将 SNPs 标记的数量增加到 1 755 个,使得家蚕基因组中平均 0.81 cM(约 270 kb)就有 1 个 SNPs 标记,利用该标记建立的高密度连锁图谱,已经将 87% 的家蚕基因组测序结果成功地拼接到了家蚕的 28 个连锁群上(Xia *et al.* 2004; 2008),这些研究结果显示出 SNPs 标记及其分型在家蚕遗传学研究和应用中的作用越来越重要。

3 SNPs 标记在昆虫种群遗传学研究中的应用

种群遗传学研究在很大程度上依赖于特定的遗传标记,每种新的遗传标记的发现和应用都会对其发展产生重要影响(Buckler and Thornsberry, 2002)。在分子水平上的种群遗传学研究取决于能否得到足够的 DNA 多态性,尽管与一些常用的分子标记(如 SSR)相比,二等位基因的 SNPs 显得多态性并不高,但如果考虑到由许多单碱基位点变异所构成的单倍型时,SNPs 在昆虫基因组中非常丰富,这一丰富的变异性为开展种群水平的研究提供了有力的工具。

蚊媒种类表型多态性强,传毒能力差异大,利用 SNPs 标记研究其种群遗传变异和基因交流,对于蚊媒的监测追踪、预测重要遗传性状(比如抗药性、传毒能力)的时空分布具有重要意义。Beck 等(2005)收集了美国爱荷华州、明尼苏达州、威斯康星州的 564 头 *Ochlerotatus triseriatus* 的蚊虫样本,利用 SNPs 评估该蚊的线粒体 ND4 基因交流程度和模式,只检测到 4 个单倍型,检测到的 8 个 SNPs 中有 7 个处于连锁不平衡状态,其中仅存在一个非同义突变(Met $\longleftrightarrow$ Ile),说明不同地理种群基因间遗传分化程度较低,不同种群间的遗传距离没有显著差异,作者认为采集地之间的河流与公路的阻隔并没有阻碍该蚊的基因交流而引起遗传隔离。与上述检测样本数量相似情况下,在墨西哥 *A. aegypti* 的 ND4 基因中检测到 25 个单倍型

(Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2000) 在委内瑞拉 *A. aegypti* 的 ND4 基因中则检测到 6 个单倍型, 该蚊个体间存在 11 个 SNPs, 作者认为是由于安第斯山的地理隔离阻碍了该蚊的基因交流所致 (Urdaneta-Marquez *et al.* 2008)。上述两种蚊类的差异可能是由于每种蚊均存在各自的交配系统, 同时也反映了 *O. triseriatus* 在迅速扩张过程中由于瓶颈效应的影响增加了连锁不平衡。这些研究对于昆虫种群的遗传突变和估计以及种群演变和分化提供了科学依据。

4 SNPs 标记在昆虫抗药性研究中的应用

当杀虫剂被频繁地、高剂量地用来防治害虫时, 由于杀虫剂的选择作用, 导致害虫对杀虫剂产生不同程度的抗药性。这种抗药性多为基因控制, 显性遗传, 是一种人为的、自然选择的重要进化现象。当前人们对 SNPs 产生如此之大的兴趣就在于它作为一种标记, 可以用于鉴定导致这种生物特定性状的基因。因此, 基于 SNPs 标记较早发现害虫对杀虫剂的抗药性是害虫抗药性治理策略的先决条件, 不仅比传统的生物测定方法更准确、可靠, 而且可以指导新农药的研发。

研究发现电压敏感的钠通道作为 DDT 和拟除虫菊酯类杀虫剂的主要靶标, 昆虫和其他节肢动物对 DDT 和拟除虫菊酯类杀虫剂的敏感性降低会产生击倒抗性 (*kdr*), 该基因的点突变是昆虫产生击倒抗性的主要分子机制。来自美国、英国、日本三地的头虱 *Pediculus humanus capitis* De Geer 样本检测发现电压敏感的钠通道基因的 3 个点突变 (M815I, T929I, L932F) 会导致头虱对苄氯菊酯抗药性 (Lee *et al.* 2000; Tomita *et al.* 2003)。之后, 在丹麦头虱样本内也检测到导致头虱对苄氯菊酯抗药性的后 2 个突变 (T929I, L932F) 及一个新突变 (G943A) 的存在, 这说明 T929I, L932F 这 2 个突变广泛存在于对苄氯菊酯产生抗药性的头虱内, 尤其是突变 T929I 的碱基替换引入了 *SspI* 内切酶酶切位点 (Kristensen 2005)。基于上述研究方法同样发现在德国小蠊 *Blattella germanica* 的 *Rdl* 基因存在对狄氏剂产生抗药性 A302S 突变 (G $\leftrightarrow$ T 颠换), 该突变引入了 *BsmAI* 内切酶酶切位点 (Hansen *et al.* 2005)。

乙酰胆碱酯酶是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂作用的靶标位点, 该基因的点突变是引起乙酰

胆碱酯酶对杀虫剂不敏感性上升的重要机制, 目前已有 60 多种昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性, 其抗性均是由于编码 *AChE* 基因突变引起的 (Oakeshott *et al.* 2005)。在田间采集库蚊 *C. pipiens* 的 3 个复合种样本内均存在由 *AChE* 基因 G119S 突变引起的氨基甲酸酯类杀虫剂抗药性, 从而引起对氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗药性 (Weill *et al.* 2003)。然而, 在另外一个库蚊 *C. tritaeniorhynchus* 的 *AChE* 基因内存在的 P331T 突变同时对有机磷和氨基甲酸酯类两类杀虫剂均产生抗药性 (Nabeshima *et al.* 2004), 该突变位点在桃蚜 *Myzus persicae* 和二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 中也被检测到。与此相类似, 棉蚜 *Aphis gossypii* 的 *AChE* 基因 S431F 的突变会引起对抗蚜威不敏感, S431F 和 A302S 突变同时存在会引起对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂均不敏感 (Andrews *et al.* 2004)。Hawkes 等 (2005) 利用 PCR-RFLP 在橄榄果蝇 *Bactrocera oleae* 的 *AChE* 基因上检测到 2 个对乐果不敏感的突变 (I214V 和 G488S), 分析发现这 2 个突变位点可以分别被 *AccI* 和 *BssHII* 内切酶酶切。

上述昆虫抗药性的分子机制主要是基于单个靶标 (钠通道基因或 *AChE* 基因) 抗性的研究, 对多靶标抗性的分子机制研究相对较少。Cassanelli 等 (2005) 在桃蚜的 *AChE* 基因和 *Para* 型-钠通道基因内就检测到同时存在对氨基甲酸酯类和拟除虫菊酯类杀虫剂不敏感的 S431F 和 L1014F 2 个非同义突变位点, 而且这两个突变位点可以分别被 *BssSI* 和 *SspI* 内切酶酶切。上述方法同样也被应用在检测 Q 型烟粉虱对氨基甲酸酯类和有机磷类杀虫剂的抗性研究上, 利用 *DdeI* 和 *BsrI* 两种内切酶可以分别检测 Q 型烟粉虱钠通道基因对拟除虫菊酯类杀虫剂不敏感的 L925I 突变以及 *AChE* 基因对有机磷类杀虫剂不敏感的 T929V 突变 (Tsagkarakou *et al.* 2009)。这两项研究为制定昆虫抗性治理策略, 减缓抗药性产生的速度提供了支持。

细胞色素 P450 是昆虫体内的主要解毒酶系, 该酶系的活性增强被认为是昆虫产生代谢抗性的主要生理机制。从分子机制角度来说, 该酶活性增强则主要是由于编码该酶系的 *CYP* 基因表达的变化。B 型和 Q 型烟粉虱 *CYP* 基因家族内的 *CYP6CM1* 外显子区域发生的 3 个 SNPs 造成 *CYP*

基因过量表达引起所编码的 P450 单加氧酶氧化解毒能力增强,进而使烟粉虱对吡虫啉产生抗性 (Rauch and Nauen 2003 ; Karunker *et al.* 2008)。这 3 个 SNPs 标记的发现为鉴定 B 型和 Q 型烟粉虱的抗性与敏感种群以及筛选吡虫啉和其他烟碱类杀虫剂防治 B 型和 Q 型烟粉虱提供了重要依据。

5 结论与展望

SNPs 作为第三代遗传标记具有诸多优点,为昆虫学研究提供了更广阔的应用前景,但目前的许多实际问题制约了 SNPs 在标记昆虫基因组研究中的应用。第一,开发和制作 SNPs 标记的图谱需要自动化、高通量的分型方法,由于开发、检测成本过高,一般实验室难以开展该工作。第二,该标记研究主要集中在果蝇、蚊媒、家蚕等一些模式生物,而且大多数普通的 SNPs 位点包含的信息量较少,主要用于研究昆虫的抗药性机理和种群遗传结构变化。第三,SNPs 还存在专利问题,如果 SNPs 的开发得不到足够经费的支持,会导致缺乏大规模的、具有普遍意义的昆虫 SNPs 数据库,而且能提供详尽的 SNPs 位点信息供科研工作者使用的非常少,无法确定利用某个 SNPs 解决特定的遗传问题。第四,表达序列标签 (EST) 包含的大量 SNPs 位点可能存在基因型分析的突变是否中性问题使得其应用范围受到了制约。

可以相信随着昆虫基因组计划的逐步深入,高密度基因芯片、DNA 微阵列技术等 SNPs 高通量分型技术的不断完善、检测成本的下降,SNPs 分子标记技术与其它生物技术的有机结合,在对非模式昆虫的快速的鉴定、抗药性的分子遗传机制、种群历史衍化和地理分布格局、昆虫遗传图谱的构建以及关联分析等研究中将发挥巨大的作用。此外,在以上研究内容的基础上应加强利用 SNPs 标记开拓昆虫的病原物与媒介昆虫互作机制、重要经济性状的遗传机理分析及功能基因的快速定位和筛选等新领域,推动昆虫学科的发展。

参考文献 (References)

Andrews MC ,Callaghan A ,Field LM ,Williamson MS ,Moore GD , 2004. Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid , *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol. Biol.* ,13 (5) :555—561.

Bass C ,Williamson MS ,Field LM ,2008. Development of a

multiplex real-time PCR assay for identification of members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Acta Trop.* ,107 :50—53.

Bass C ,Williamson MS ,Wilding CS ,Donnelly MJ ,Field LM , 2007. Identification of the main malaria vectors in the *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* ,6 :155.

Beck ET ,Bosio CF ,Geske DA ,Blair CD ,Beaty BJ ,Black WC , 2005. An analysis of gene flow among midwestern populations of the mosquito *ochlerotatus triseriatus*. *Trop. Med. Hyg.* ,73 (3) :534—540.

Behura SK ,2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol. Ecol.* ,15 :3087—3113.

Black IV WC , Vontas JG , 2007. Affordable assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in insects. *Insect Mol. Biol.* ,16 (4) :377—387.

Bourguet D ,Fonseca D ,Vourch G ,Dubois MP ,Chandre F , Severini C ,Raymond M ,1998. The acetylcholinesterase gene Ace: a diagnostic marker for the *Pipiens* and *Quinquefasciatus* forms of the *Culex pipiens* complex. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* ,14 :390—396.

Buckler IV ES , Thornsberry JM , 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr. Opin. in Plant Biol.* ,5 :107—111.

Cassanelli S ,Cerchiari B ,Giannini Sara ,Bizzaro D ,Mazzoni E ,Manicardi GC ,2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and kdr insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.* , 61 (1) :91—96.

Chen D ,Ahlfors A ,Schnorrer F ,Kalchauer I ,Fellner M , Viragh E ,Sylvänen KI ,Dickson JB ,2008. High-resolution , high-throughput SNP mapping in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods* ,5 :323—329.

Cheng TC ,Xia QY ,Qian JF ,Liu C ,Lin Y ,2004. Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of silkworm , *Bombyx mori* ,inbred strain Dazao. *Insect Biochem. Mol. Biol.* ,34 :523—530.

Fulton RE ,Salasek ML ,DuTeau NM ,Black IV WC ,2001. SSCP Analysis of cDNA markers provides a dense linkage map of the *Aedes aegypti* genome. *Genetics Soc. America* , 158 :715—726.

Gorochotegui-Escalante N , Munoz MD ,Fernandez-Salas I , Beaty BJ ,Black WC IV ,2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* ,62 :200—209.

Hansen KK ,Kristensen M ,Jensen KMV ,2005. Correlation of a resistance-associated *Rdl* mutation in the German cockroach *Blattella germanica* (L) ,with persistent dielidrin

- resistance in two Danish field populations. *Pest Manag. Sci.* 61:749—753.
- Hawkes NJ, Janes RW, Hemingway J, Vontas J, 2005. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pestic. Biochem. Phys.* 81:154—163.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, José MC, Ribeiro, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai ZW, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chatuverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Flanigan M, Grundschober—Freimoser A, Friedli L, Gu ZP, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke ZX, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin JJ, Lobo NF, Lopez JR, Malek J A, McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Murphy ME, 2002. The genome sequence of the Malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298:129—148.
- Hoskins RA, Phan AC, Naemuddin M, Mapa FA, Ruddy DA, Ryan JJ, Young LM, Wells T, Kopczynski C, Ellis MC, 2001. Single nucleotide polymorphism markers for genetic mapping in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11:1100—1113.
- Jones CM, Gorman K, Denholm I, Williamson MS, 2008. High-throughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using TaqMan allele-selective PCR. *Pest Manag. Sci.* 64:12—15.
- Karunker I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S, 2008. Overexpression of cytochrome P450 *CYP6CM1* is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Molec.* 38:634—644.
- Kristensen M, 2005. Identification of sodium channel mutations in human head louse (Anoplura: Pediculidae) from Denmark. *J. Med. Entomol.* 42:826—829.
- Lander ES, 1996. The new genomics: global views of biology. *Science* 274:536—539.
- Lee SH, Yoon KS, Williamson MS, Goodsonb SJ, Takano-Lee M, Edmana JD, Devonshireb AL, Clarka JM, 2000. Molecular analysis of *kdr*-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66:130—143.
- Martin SG, Dobi KC, Johnston D, 2001. A rapid method to map mutations in *Drosophila*. *Genome Biol.* 2(9):1—12.
- Morlais I, Severson DW, 2003. Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 12(6):631—639.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T, 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:94.
- Niehuis O, Judson AK, Werren JH, Hunter WB, Dang PM, Dowd SE, Grillenberger B, Beukeboom LW, Gadau J, 2007. Species-diagnostic single-nucleotide polymorphism and sequence-tagged site markers for the parasitic wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Econ. Entomol.* 100(4):1033—1036.
- Oakeshott JG, Devonshire AL, Claudianos C, Sutherland TD, Horne I, Campbell PM, Ollis DL, Russell RT, 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chem-Biol. Interact.* 157/158:269—275.
- Rafalski JA, 2002. Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 5:94—100.
- Rauch N, Nauen R, 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid crossresistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54:165—176.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:520—529.
- Teeter K, Naemuddin M, Gasperini R, 2000. Haplotype dimorphism in a SNP collection from *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 288:63—75.
- Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Kasai S, 2003. Molecular analysis of a para sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 40:468—474.
- Tsagkarakou A, Nikou D, Roditakis E, Sharvit M, Morin S, Vontas J, 2009. Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and organophosphate resistance mutations in the Q biotype of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pestic. Biochem. Phys.* 94:49—54.

- Urdaneta-Marquez L , Bosio C , Herrera F , Rubio-Palis Y , Salasek M , Black IV WC. ,2008. Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* ,78 (3) : 479—491.
- Walker ED ,Thibault AR ,Thelen AP ,Bullard BA ,Huang J , Odiere MR ,Bayoh NM ,Wilkins EE ,Vulule JM ,2007. Identification of field caught *Anopheles gambiae* s. s. and *Anopheles arabiensis* by *TaqMan* single nucleotide polymorphism genotyping. *Malar. J.* 6:23.
- Weill M ,Lutfalla G ,Mogensen K ,Chandre F ,Berthomieu A , Berticat C ,Pasteur N ,Philips A ,Fort P ,Raymond M ,2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423:136.
- Wilkins EE ,Howell PI ,Benedict MQ ,2006. IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for *Anopheles gambiae* species identification ,Mopti and Savanna rDNA types ,and resistance to dieldrin in *Anopheles arabiensis*. *Malar. J.* 5:125.
- Wondji CS ,Hemingway J ,Ranson H ,2007. Identification and analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the mosquito *Anopheles funestus* ,malaria vector. *BMC Genomics* , 8:5.
- Xia Q ,Wang J ,Zhou Z ,Li R ,Fan W ,Cheng D ,Cheng T ,Qin J ,Duana J ,Xu H ,Li Q ,Li N ,Wang M ,Dai F ,Liu C ,Lin Y , Zhao P ,Zhang H ,Liu S ,Zha X ,Li C ,Zhao A ,Pan M ,Pan G ,Shen Y ,Gao Z ,Wang Z ,Wang G ,Wu Z ,Hou Y ,Chai C , Yu Q ,He N ,Zhang Z ,Li S ,Yang H ,Lu C ,Wang J ,Xiang Z ,Mita K ,Kasahara M ,Nakatani Y ,Yamamoto K ,Abe H , Ahsan B ,Daimoni T ,Doi K ,Fujii T ,Fujiwara H ,Fujiyama A ,Futahashi R ,Hashimoto S ,Ishibashi J ,Iwami M , Kadono—Okuda K ,Kanamori H ,Kataoka H ,Katsuma S , Kawaoka S ,Kawasaki H ,Kohara Y ,Kozaki T ,Kuroshu RM , Kuwazaki S , Matsushima K , Minami H , Nagayasu Y , Nakagawa T ,Narukawa J ,Nohata J ,Ohishi K ,Ono Y , Osanai—Futahashi M ,Ozaki K ,Qu W ,Roller L ,Sasaki S , Sasaki T ,Seino A ,Shimomura M ,Shimomura M ,Shin—I T , Shinoda T ,Shiotsuki T ,Suetsugu Y ,Sugano S ,Suwa M , Suzuki Y ,Takiya S ,Tamura T ,Tanaka H ,Tanaka Y , Touhara K , Yamada T ,Yamakawa M ,Yamanaka N , Yoshikawa H ,Zhong YS ,Shimada T ,Morishita S ,2008. The genome of a lepidopteran model insect ,the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38 (12) :1036—1045.
- Xia Q ,Zhou Z ,Lu C ,Cheng D ,Dai F ,Li B ,Zhao P ,Zha X , Cheng T ,Chai C ,Pan G ,Xu J ,Liu C ,Lin Y ,Qian J ,Hou Y , Wu Z ,Li G ,Pan M ,Li C ,Shen Y ,Lan X ,Yuan L ,Li T ,Xu H ,Yang G ,Wan Y ,Zhu Y ,Yu M ,Shen W ,Wu D ,Xiang Z , Yu J ,Wang J ,Li R ,Shi J ,Li H ,Li G ,Su J ,Wang X ,Li G , Zhang Z ,Wu Q ,Li J ,Zhang Q ,Wei N ,Xu J ,Sun H ,Dong L ,Liu D ,Zhao S ,Zhao X ,Meng Q ,Lan F ,Huang X ,Li Y , Fang L ,Li C ,Li D ,Sun Y ,Zhang Z ,Yang Z ,Huang Y ,Xi Y ,Qi Q ,He D ,Huang H ,Zhang X ,Wang Z ,Li W ,Cao Y , Yu Y ,Yu H ,Li J ,Ye J ,Chen H ,Zhou Y ,Liu B ,Wang J ,Ye J ,Ji H ,Li S ,Ni P ,Zhang J ,Zhang Y ,Zheng H ,Mao B , Wang W ,Ye C ,Li S ,Wang J ,Wong GK ,Yang H ; Biology Analysis Group ,2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) . *Science* ,306 (5703) :1937—1940.
- Yamamoto K , Narukawa J , Kadono—Okuda K , Nohata J , Sasanuma M ,Suetsugu Y ,Banno Y ,Fujii H ,Goldsmith MR , Mita K , 2006. Construction of a single nucleotide polymorphism linkage map for the silkworm ,*Bombyx mori* , based on bacterial artificial chromosome end sequences. *Genetics* ,173:151—161.
- Yamamoto K , Nohata J , Kadono—Okuda K , Narukawa J , Sasanuma M , Sasanuma S , Minami H , Shimomura M , Suetsugu Y ,Banno Y ,Osoegawa K ,Jong PJ ,Goldsmith MR , Mita K ,2008. A BAC-based integrated linkage map of the silkworm *Bombyx mori*. *Genome Biol.* 9:R21.