

李辉平, 骆昕, 侯子强, 等. 基于 BSA-seq 技术挖掘糙皮侧耳抗螨候选基因[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6):1648-1656.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.024

基于 BSA-seq 技术挖掘糙皮侧耳抗螨候选基因

李辉平¹, 骆昕¹, 侯子强², 蒋宁¹, 林金盛¹, 侯立娟¹, 徐平¹, 马林¹,
曲绍轩^{1,2}

(1.江苏省农业科学院蔬菜研究所,江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014; 2.江苏大学生命科学学院,江苏镇江 212013)

摘要: 根据前期不同糙皮侧耳菌株抗螨性差异调查结果,构建了糙皮侧耳孢子单核体群体,群体内 479 个菌株抗螨性呈正态分布。利用 BSA-seq 技术对高抗和高感混池进行 SNP 和 InDel 位点的欧氏距离关联分析,将抗螨性候选基因定位到一条染色体上,2 个相邻候选区域总长度为 1.75 Mb,内有基因 605 个,其中非同义突变基因 353 个,移码突变基因 89 个。经功能注释以及 GO 和 KEGG 通路富集等分析,发现 26 个候选基因参与了信号传导、防御过程和次级代谢相关通路,推测这些候选基因可能与糙皮侧耳抗螨性相关。

关键词: 糙皮侧耳(平菇); 抗螨候选基因; 群体分离分析法

中图分类号: S646.1⁺41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1648-09

Candidate anti-mite gene detection by BSA-seq in *Pleurotus ostreatus*

LI Hui-ping¹, LUO Xin¹, HOU Zi-qiang², JIANG Ning¹, LIN Jin-sheng¹, HOU Li-juan¹, XU Ping¹,
MA Lin¹, QU Shao-xuan^{1,2}

(1. *Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*; 2. *School of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China*)

Abstract: In our previous study, it was found that there were significant differences in the resistance to *Tyrophagus putrescentiae* among different strains of *Pleurotus ostreatus*. In this study, firstly, a spore monokaryotic population of *P. ostreatus* was rapidly constructed, and the 479 strains within the population were normally distributed for mite resistance. Secondly, the Euclidean distance association analysis of SNP and InDel sites was performed between the highly resistant and highly sensitive pools using BSA-seq technology. The candidate genes for mite resistance were located on one chromosome. The two adjacent candidate regions had a total length of 1.75 Mb and contained 605 genes, including 353 non-synonymous and 89 frameshift mutated genes. Finally, after functional annotation, GO and KEGG pathway enrichment analysis, 26 candidate genes were found to be involved in signal transduction, defense processes and secondary metabolism-related pathways. It was thus inferred that these candidate genes might be related to mite resistance.

Key words: *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom); candidate anti-mite genes; bulked segregant analysis

收稿日期:2022-04-01

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(32001911);财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-20)

作者简介:李辉平(1982-),男,江苏丹阳人,硕士,副研究员,主要从事食用菌遗传育种研究。(Tel)025-84392806;(E-mail)lhp211@163.com

通讯作者:曲绍轩,(E-mail)ququzhibao@163.com,qux@jaas.ac.cn

糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*),又称平菇、蚝菇,其栽培方式简单粗放、抗病虫害能力强、产量高,栽培技术需求低,受到全球食用菌生产者的欢迎,是世界

界重要栽培食用菌之一^[1]。又因其富含膳食纤维、蛋白质、矿物质、维生素和多种活性物质,越来越受到消费者的关注和欢迎^[2-4]。2020 年全国平菇产量达到 $6.829 6 \times 10^6$ t,是中国第三大栽培食用菌^[5]。

腐食酪螨(*Tyrophagus putrescentiae*)是世界性仓储害虫之一,取食各种干制食品和生物原材料,对 30 多种食用菌造成危害,是食用菌栽培过程中需要防控的主要螨虫。该螨以刺吸式口器取食菌丝体和子实体,同时在培养基上传播病原菌^[6]。发菌期暴发螨虫可造成大规模减产甚至绝收,出菇期暴发螨虫则可减产 30%~40%^[7-8]。

目前,食用菌害螨主要依赖化学防治。但由于螨虫个体微小、生长周期短、变异快,已对多种药剂产生抗药性,越来越难防治^[9]。培育和利用抗螨食用菌品种,可有效地解决田间螨害问题,降低防控成本,推进食用菌绿色安全生产。本研究团队前期研究发现,腐食酪螨在中国不同栽培糙皮侧耳品种上繁殖力、发育周期、产卵量、若螨死亡率等性状存在显著差异,表明国内不同平菇菌株对腐食酪螨存在不同的抗性水平^[10]。然而,关于糙皮侧耳对螨虫抗性的来源和遗传机制尚不清楚,国内外也尚无抗螨性食用菌品种的相关报道。

群体分离分析法(Bulked segregant analysis, BSA)通过表型差异构建分离群体快速筛选和定位目标性状相关基因^[11]。该方法在动植物功能基因定位研究中应用十分广泛^[12-13],在食用菌功能基因定位研究中也逐步得到了应用^[14]。BSA-seq 技术基于高通量测序技术,具有实验周期短、定位准确,开发的分子标记分布均匀、密度高等优点^[15-16]。

本研究以一株野生糙皮侧耳菌株 Pos045 为试验材料,构建担孢子分离群体并开展抗螨性鉴定,分析其对腐食酪螨产生抗性的遗传基础,通过 BSA-seq 技术对潜在抗性基因进行初步定位,为开展糙皮侧耳抗螨分子育种打下基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 糙皮侧耳 Pos045 由江苏省农业科学院提供。

1.1.2 供试螨虫 腐食酪螨由江苏省农业科学院提供,室内继代饲养^[10]。

1.1.3 培养基 PDA 固体培养基,购自台湾 MDBio

公司,按说明书配制灭菌备用。棉籽壳出菇培养基,按质量百分比棉籽壳 55%,玉米芯 30%,麸皮 15%,混匀后加水搅拌至含水量 65%,用 330 ml 培养瓶装至瓶肩,121 °C 高压蒸汽灭菌 90 min 备用。平菇抗螨性鉴定培养基,棉籽壳 200 g(煮水 30 min 过滤),葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,加水定容到 1 L 后 121 °C 蒸汽高压灭菌 30 min 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 孢子单核体群体构建 糙皮侧耳 Pos045 经 PDA 培养基活化后接种至棉籽壳出菇培养基,25 °C 下避光培养至菌丝体长满培养瓶,降温至 18 °C 进行催蕾出菇。待菌盖开始舒展时,在超净台中悬于灭菌的锥形瓶中静置 24 h,用 200 μ l 无菌水冲洗瓶底孢子即为孢子悬浮液,4 °C 短期保存待用。将孢子悬浮液稀释至 500 CFU/mL 以下,取 100 μ l 涂布 90 mm 平板,25 °C 下避光培养 5 d 后,挑取单个菌落进行继代培养,显微镜检查有无锁状联合。挑取不少于 400 个单核菌株建立 Pos045 单核体群体。

1.2.2 抗螨性鉴定 以本实验室建立的平皿菌丝体接种螨虫取食孔洞计数法进行抗螨性鉴定。菌丝活化后接种至抗螨性鉴定培养基,菌丝长满平板后接种 30 mg 约 500 头螨虫,透气膜封闭 25 °C 下继续培养,5 个重复。接种螨虫 48 h 后,借鉴玉米抗玉米螟鉴定技术规范(NY/T 1248.5-2006),观测螨虫取食菌丝后形成的孔洞数量和直径大小,统筹划分为害级别 1~9 级。计算为害程度的平均值,为害程度的平均值 = \sum (为害级别 \times 该级别菌株数) / 调查总数,并据此划分抗性等级,共分 5 级:1.0~2.9 为高抗;3.0~4.9 为抗;5.0~6.9 为中抗;7.0~8.9 为感;9.0 为高感。

1.2.3 极端混池构建并测序 群体其他表型数据尽量一致,根据抗性数据,选择高抗/高感极端株各 20 株构建极端表型混池。单株分别使用 MimiBEST Plant DNA 纯化试剂盒(宝生物公司产品)提取 DNA,等量混合构建 DNA 混池。利用 Illumina HiSeq 平台(北京百迈克生物科技有限公司产品)完成建库测序,单池测序数据 2 G 以上。

1.3 数据分析

基于 NCBI 公布的糙皮侧耳参考基因组(ASM1446616v1)信息^[17],通过 BWA 进行数据比对^[18],Picard 去重复^[19]。过滤掉变异质量值低于 30、*QD* 值低于 2.0、*MQ* 值低于 40、*FS* 值高于 60 的位

点^[20-21]。通过 SnpEff 完成 SNP 和 InDel 的注释^[22]。对过滤掉多重和无差异后的位点通过欧式距离 (Euclidean distance, ED) 方法进行关联分析, 然后采用 DISTANCE 方法对 ED 值进行拟合, 统计并根据关联阈值判定候选区域^[23]。对 SNP 和 InDel 2 个关联区域取交集缩小候选区间, 应用 BLAST 进行 NR、Swiss-Prot、GO、KEGG 等多个数据库的基因注释^[24]。

2 结果与分析

2.1 糙皮侧耳单核体群体抗性遗传分析

以抗螨性的糙皮侧耳 Pos045 为亲本, 共挑取 479 个 Pos045 担孢子单核菌株建立分离群体, 其对螨虫抗性呈现近似正态分布, 表明糙皮侧耳抗螨性符合数量性状遗传 (图 1)。其中鉴定为高感的菌株 48 株, 高抗 54 株, 分别从中选取菌落大小、菌丝疏密等其他外观性状相似的菌株各 20 株, 构建高感/高抗混池。

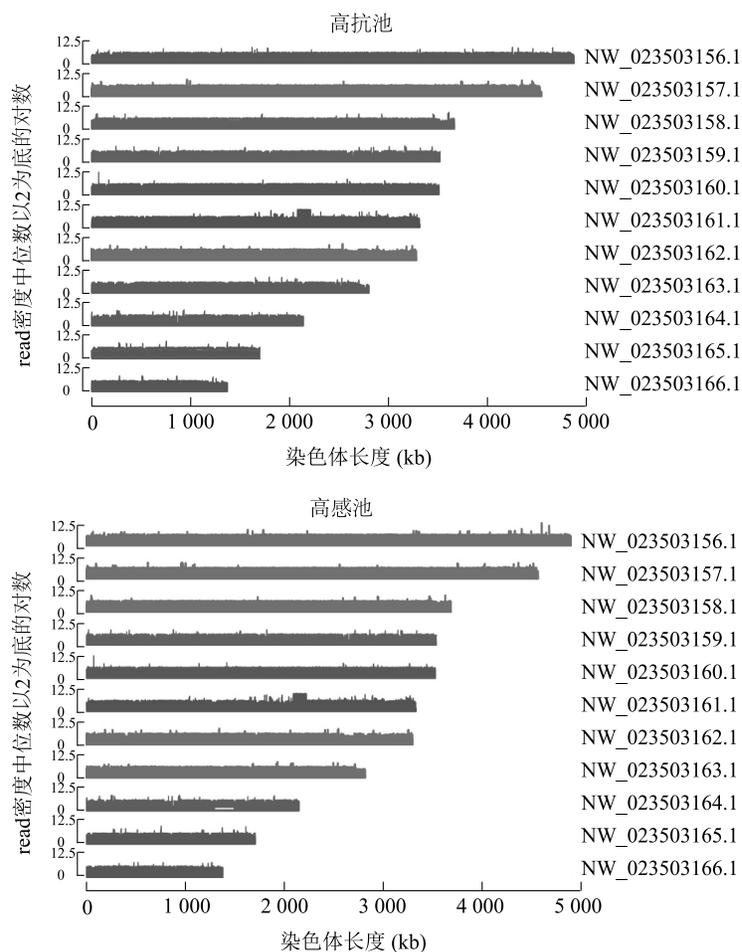


图2 测序数据基因组覆盖深度分布及插入片段长度分布

Fig.2 Genome coverage depth distribution and insert size distribution

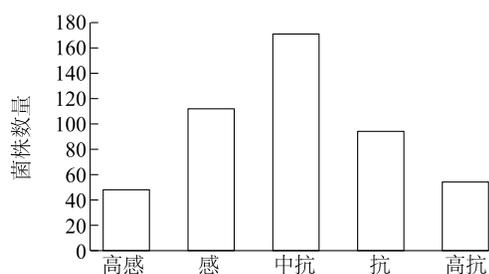


图1 糙皮侧耳 Pos045 单核体群体抗性分布

Fig.1 Resistance distribution of *Pleurotus ostreatus* Pos045 monokaryotic population

2.2 测序数据量及数据质量

高感/高抗混池通过测序、过滤后, 得到 5 G 高质量数据, 平均 Q_{30} 值达到 94.70%, 平均 G+C 碱基含量 46.86%。read 平均比对效率达到 81.31%, 总体测序深度超过 $46\times$ (总碱基数与物种基因组大小的比值), 基因组覆盖率为 97.20%, 文库片段大小呈单峰正态分布 (图 2)。所得测序数据质量较好, 可靠性较高。

2.3 变异位点检测

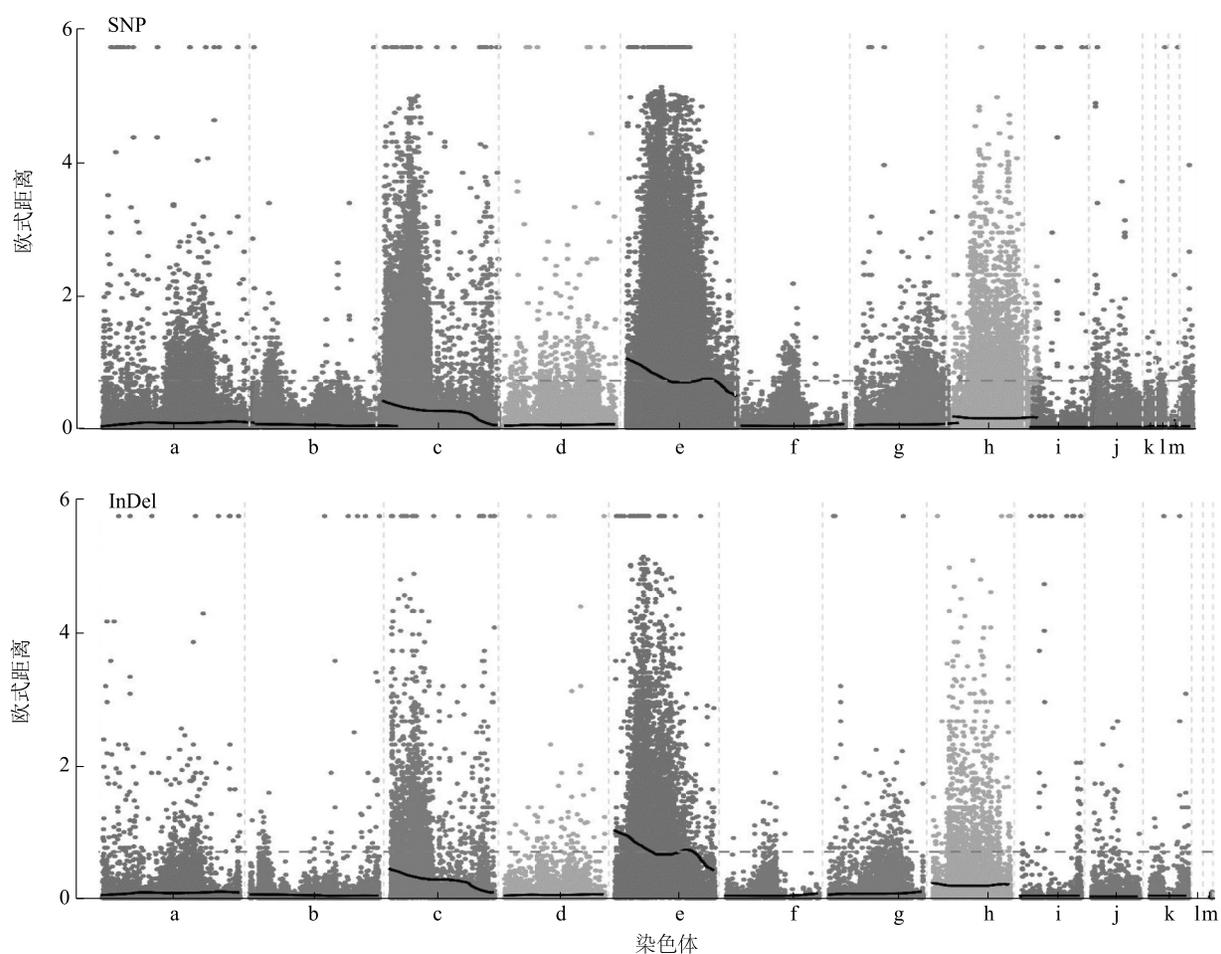
与参考基因组比对后,高抗池共检测到612 863个SNP,高感池检测到542 869个SNP,两个混池之间去掉相同位点后共获得105 323个SNP。根据检测SNP位点所在的基因位置信息,SNP位点分布在13个区域,其中位于同义突变、基因上游、基因下游、非同义突变、内含子的SNP位点最多,其余的则分布于可变剪切位点、终止子提前、终止子丢失、基因区间、3'非翻译区、5'非翻译区等区域中,其中13 325个SNP引起非同义突变。高抗池共检测到102 721个InDel,其中11 602个在基因编码区。高感池检测到91 711个InDel,有10 372个在基因编码区。两个混池之间去掉相同位点后共获得22 025个InDel。根据基因注释位

置信息,InDel位点分布在基因上/下游、内含子、移码突变等15个功能区或类型,其中引起移码突变的InDel位点1 571个。

2.4 变异位点关联分析

过滤后共获得556 886个高质量SNP位点。ED值拟合关联值分布如图3所示。根据关联阈值(0.70)进行判定,得到2个可信候选区域,合计总长度为1.87 Mb,包含658个基因注释信息,其中有370个基因存在非同义突变位点。

分析得到94 456个高质量可信InDel位点。ED值拟合关联值分布如图3所示。根据关联阈值(0.69)判定得到2个候选区域,共1.75 Mb,含611个基因,其中89个基因具有移码突变位点。



a: NW_023503156.1; b: NW_023503157.1; c: NW_023503158.1; d: NW_023503159.1; e: NW_023503160.1; f: NW_023503161.1; g: NW_023503162.1; h: NW_023503163.1; i: NW_023503164.1; j: NW_023503165.1; k: NW_023503166.1; l: NW_023503167.1; m: NW_023503168.1。

图3 SNP和InDel关联抗螨候选基因的区间

Fig.3 Identification of anti-mite candidate gene intervals using SNP and InDel association

对 SNP 和 InDel 两种方法关联抗螨候选基因区域取交集,得到 2 个与抗螨候选基因相关的候选区域,都位于参考基因组(ASM1446616v1)中 scaffold NW_023503160.1 上。关联区域总长度为 1.75 Mb,共包含基因 605 个,其中非同义突变基因 353 个,移码突变基因 89 个。

2.5 候选区域筛选与功能注释

对候选区间内的 605 个基因进行多个数据库注

释,NR 注释到 605 个、NT 注释到 605 个、trEMBL 注释到 602 个、SwissProt 注释到 269 个、GO 注释到 409 个、KEGG 注释到 302 个、COG 注释到 198 个。KEGG 和 GO 富集部分结果见图 4、图 5)。在 KEGG 通路富集中,富集到 ABC 转运蛋白、MAPK 信号通路、吡啶生物碱合成、吡啶二萜生物碱合成、萜类骨架合成等相关基因 26 个(表 1)。这些基因都有可能与平菇对螨虫抗性相关,需要进一步验证。

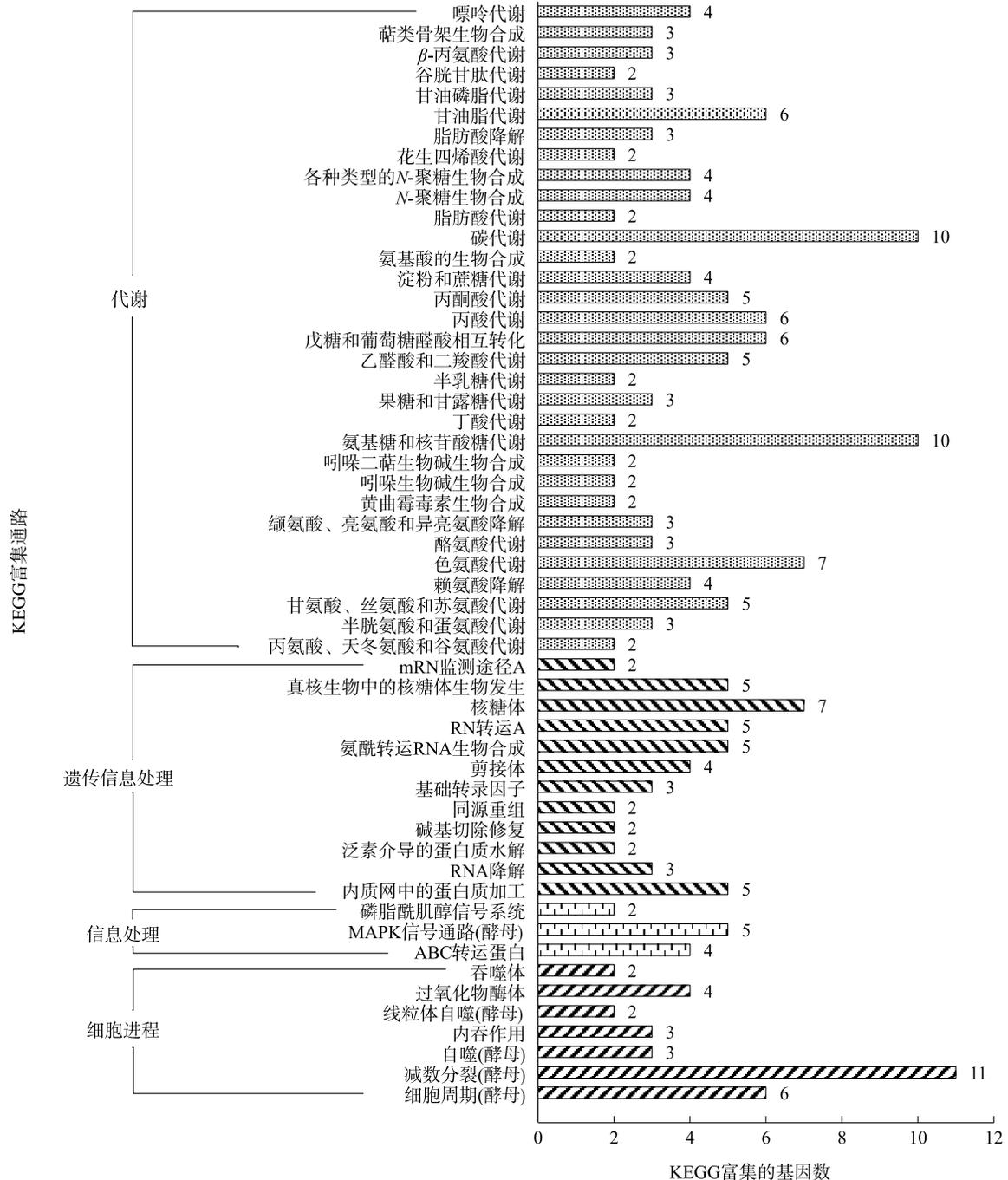


图 4 注释基因在 KEGG 通路中富集结果

Fig.4 Enrichment results of annotated genes in KEGG pathway

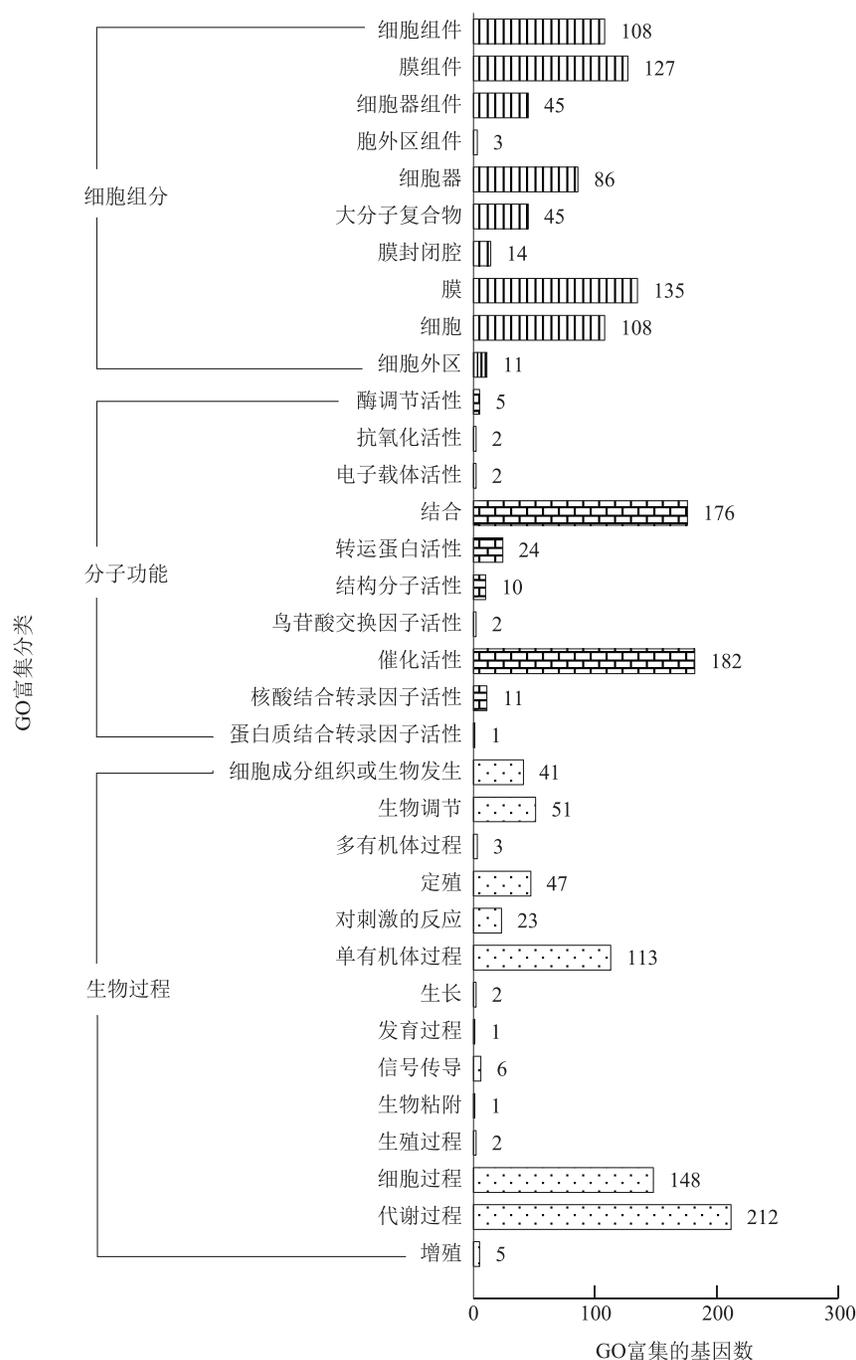


图5 注释基因在 GO 通路中富集结果

Fig.5 Enrichment results of annotated genes in GO pathway

3 讨论

BSA 分析方法利用构建极端表型群体的策略来进行经济且快速的连锁标记筛选或 QTL 定位。随着近十几年来高通量测序技术的不断发展,测序成本逐步降低,加速了 BSA-seq 分析方法在不同物种中的应用^[25-26],包括酵母^[27-28]、农作物^[29-32]、园艺作物^[33-34]、

果树^[35-36]、脊椎动物^[37-39]和昆虫^[40-41]等。研究中,我们针对 Pos045 的单核体群体进行抗螨性 BSA 分析,充分利用了担子菌孢子单核体易获取、易保存的优势,避免了双核体和多核体杂合基因型对表型数据的干扰,有助于提高定位准确度和精准度。无需亲本测序的分析方法,可以省却亲本基因纯合培育的时间,加快抗性机制研究进程。

表 1 候选区间内相关基因信息

Table 1 Related genes information in the candidate interval

编号	基因	KEGG 通路	突变类型	功能注释
1	PC9H_007242	ABC 转运蛋白	同义突变	ABC 转运蛋白
2	PC9H_007243	ABC 转运蛋白	非同义突变	ABC 转运蛋白
3	PC9H_007244	ABC 转运蛋白	非同义突变	ABC 转运蛋白
4	PC9H_007329	ABC 转运蛋白	非同义突变	ABC 转运蛋白
5	PC9H_007159	MAPK 信号通路	非同义突变	G 蛋白 α 亚基
6	PC9H_007269	MAPK 信号通路	同义突变	细胞分裂控制蛋白质
7	PC9H_007426	MAPK 信号通路	同义突变	蛋白激酶
8	PC9H_007438	MAPK 信号通路	同义突变	蛋白激酶
9	PC9H_007949	MAPK 信号通路	同义突变	蛋白磷酸酶
10	PC9H_007351	磷脂酰肌醇信号通路	移码突变	磷脂酰肌醇激酶
11	PC9H_007884	磷脂酰肌醇信号通路	非同义突变	磷脂酰胞苷酰转移酶
12	PC9H_007157	吡啶生物碱合成	同义突变	牛黄草碱脱氢酶
13	PC9H_007212	吡啶生物碱合成	非同义突变	牛黄草碱脱氢酶
14	PC9H_007186	吡啶二萜生物碱合成	非同义突变	FAD 依赖性单加氧酶
15	PC9H_007417	吡啶二萜生物碱合成	非同义突变	FAD 依赖性单加氧酶
16	PC9H_007405	泛素介导的蛋白质水解	同义突变	细胞分裂周期蛋白质
17	PC9H_007911	泛素介导的蛋白质水解	非同义突变	E3 泛素蛋白连接酶
18	PC9H_007298	萜类骨架生物合成	同义突变	二磷酸甲羟戊酸脱羧酶
19	PC9H_007321	萜类骨架生物合成	非同义突变	乙酰转移酶
20	PC9H_007921	萜类骨架生物合成	同义突变	磷酸戊酸激酶
21	PC9H_007936	二萜生物合成	非同义突变	细胞色素 P450
22	PC9H_007872	倍半萜和三萜生物合成	同义突变	法呢基二磷酸法呢基转移酶
23	PC9H_007372	泛醌和其他萜类醌生物合成	非同义突变	酰基辅酶 A 合成酶
24	PC9H_007366	次级代谢产物生物合成	非同义突变	半缩醛乙酸还原酶
25	PC9H_007367	次级代谢产物生物合成	移码突变	半缩醛乙酸还原酶
26	PC9H_007151	次级代谢产物生物合成	非同义突变	FAD 依赖性单加氧酶

本研究对野生糙皮侧耳 Pos045 的单核体群体进行抗螨性鉴定,发现螨虫对群体内菌株取食造成的危害程度不一,呈正态分布,说明糙皮侧耳抗螨性是数量遗传,由多个基因控制。进一步,我们将糙皮侧耳的抗螨性基因定位到一条染色体(NW_023503160.1)上,共得到 2 个与抗螨性相关的相邻候选区域。已报道的植物抗虫候选基因在染色体上距离靠近并成簇状分布,如已定位的水稻抗褐飞虱基因中,22 个抗性基因在染色体上成簇存在^[42]。大量的植物抗虫性机理研究表明,害虫取食激活了多种信号途径,如植物激素(水杨酸和茉莉酸

等)的调控、MAPK 通路的激活、细胞质钙离子浓度升高、活性氧含量升高等,继而调节防御相关基因的活性,代谢出防御物质,从而对害虫产生直接抗性或间接抗性^[43]。本研究团队前期在食用菌和螨虫互动过程研究中同样发现,腐食酪螨取食可以诱导食用菌产生大量萜烯类物质,这些挥发性倍半萜在螨虫识别宿主真菌方面发挥了重要作用^[44]。而机械损伤和螨虫取食食用菌菌丝体,对其转录组和蛋白质组的影响存在显著差异。这些结果都喻示着,食用菌在螨虫长期取食胁迫下,可能产生了基于次级代谢产物抗螨的机制。本研究中,我们在初定位候

选区间内经功能注释以及GO和KEGG通路富集分析,发现26个基因参与了信号传导、防御过程和次级代谢相关通路,推测这些候选基因可能与抗螨性相关,但具体的功能仍需进一步分析和验证。

4 结论

糙皮侧耳抗螨性表现为数量性状,基于BSA-Seq技术将候选基因定位在NW_023503160.1上总长度为1.75 Mb的相邻2个候选区域,共包含605个基因信息,其中功能分析结果表明有26个基因值得优先关注。这些候选基因为食用菌抗螨性基因挖掘和遗传改良奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] SANCHEZ C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(5): 1321-1337.
- [2] WAKTOLA G, TEMESGEN T. Pharmacological activities of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) [J]. Res Microbiol, 2020, 4(2): 688-695.
- [3] ADAMS S, CHE D, HAILONG J, et al. Effects of pulverized oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on diarrhea incidence, growth performance, immunity, and microbial composition in piglets[J]. J Sci Food Agric, 2019, 99(7): 3616-3627.
- [4] CHOURASIA A, TIWARI A, GANESHPURKAR A, et al. Evaluation of antiarthritic effect of culinary-medicinal oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* cv. Florida (Agaricomycetes) on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats[J]. Int J Med Mushrooms, 2019, 21(11): 1123-1136.
- [5] 中国食用菌协会. 2020年度全国食用菌统计调查结果分析[J]. 中国食用菌, 2022, 41(1): 85-91.
- [6] 张艳璇,林坚贞,黄敬浩,等. 食用菌重要害螨——腐食酪螨的研究[J]. 福建省农科院学报, 1992, 7(2): 91-94.
- [7] 陆云华. 食用菌大害螨——腐食酪螨的生物学特性及防治对策[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(1): 100-101.
- [8] 兰清秀,卢政辉,范青海. 食用菌螨种类研究进展[J]. 福建农业学报, 2012, 27(1): 104-108.
- [9] JEONG E Y, KIM M G, LEE H S. Acaricidal activity of triketone analogues derived from *Leptospermum scoparium* oil against house-dust and stored-food mites[J]. Pest Manag Sci, 2009, 65(3): 327-331.
- [10] 赵红炎,刘俊杰,骆昕,等. 不同糙皮侧耳菌株对腐食酪螨生长发育的影响[J]. 食用菌学报, 2021, 28(1): 103-107.
- [11] MICHELMORE R W, PARAN I, KESSELI R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [12] ZOU C, WANG P, XU Y. Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement[J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14(10): 1941-1955.
- [13] POOL J E. Genetic mapping by bulk segregant analysis in *Drosophila*: experimental design and simulation-based inference[J]. Genetics, 2016, 204(3): 1295-1306.
- [14] 桂颖,王成晨,边银丙,等. 群体分离分析法在食用菌遗传研究中的应用进展[J]. 食用菌学报, 2020, 27(4): 179-187.
- [15] ABE A, KOSUGI S, YOSHIDA K, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(2): 174-178.
- [16] ZHANG H, WANG X, PAN Q, et al. QTL-seq accelerates QTL fine mapping through QTL partitioning and whole-genome sequencing of bulked segregant samples[J]. Mol Plant, 2019, 12(3): 426-437.
- [17] RILEY R, SALAMOV A A, BROWN D W, et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(27): 9923-9928.
- [18] LI H, DURBIN R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2010, 26(5): 589-595.
- [19] BROADINSTITUTI. Picard [CP]. <http://broadinstitute.github.io/picard/>.
- [20] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. Genome Res, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [21] REUMERS J, DE RIJK P, ZHAO H, et al. Optimized filtering reduces the error rate in detecting genomic variants by short-read sequencing[J]. Nat Biotechnol, 2011, 30(1): 61-68.
- [22] CINGOLANI P, PLATTS A, WANG LE L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff; SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3[J]. Fly (Austin), 2012, 6(2): 80-92.
- [23] HILL J T, DEMAREST B L, BISGROVE B W, et al. MMAPPR: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq[J]. Genome Res, 2013, 23(4): 687-697.
- [24] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [25] NGUYEN K L, GRONDIN A, COURTOIS B, et al. Next-generation sequencing accelerates crop gene discovery[J]. Trends Plant Sci, 2019, 24(3): 263-274.
- [26] LI Z, XU Y. Bulk segregation analysis in the NGS era: a review of its teenage years[J]. Plant J, 2021, 109(6): 1355-1374.
- [27] EHRENREICH I M, BLOOM J, TORABI N, et al. Genetic archi-

- texture of highly complex chemical resistance traits across four yeast strains[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(3): e1002570.
- [28] MEIJNEN J P, RANDAZZO P, FOULQUIÉ-MORENO M R, et al. Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9(1): 5.
- [29] MU J, HUANG S, LIU S, et al. Genetic architecture of wheat stripe rust resistance revealed by combining QTL mapping using SNP-based genetic maps and bulked segregant analysis[J]. *Theor Appl Genet*, 2019, 132(2): 443-455.
- [30] YANG Z, HUANG D, TANG W, et al. Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68433.
- [31] PANDEY M K, KHAN A W, SINGH V K, et al. QTL-seq approach identified genomic regions and diagnostic markers for rust and late leaf spot resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(8): 927-941.
- [32] SONG J, LI Z, LIU Z, et al. Next-generation sequencing from bulked-segregant analysis accelerates the simultaneous identification of two qualitative genes in soybean[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 919.
- [33] LU H, LIN T, KLEIN J, et al. QTL-seq identifies an early flowering QTL located near Flowering Locus T in cucumber[J]. *Theor Appl Genet*, 2014, 127(7): 1491-1499.
- [34] SHU J, LIU Y, ZHANG L, et al. QTL-seq for rapid identification of candidate genes for flowering time in broccoli × cabbage[J]. *Theor Appl Genet*, 2018, 131(4): 917-928.
- [35] SHEN F, HUANG Z, ZHANG B, et al. Mapping gene markers for apple fruit ring rot disease resistance using a multi-omics approach [J]. *G3 (Bethesda)*, 2019, 9(5): 1663-1678.
- [36] DOUGHERTY L, SINGH R, BROWN S, et al. Exploring DNA variant segregation types in pooled genome sequencing enables effective mapping of weeping trait in *Malus*[J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(7): 1499-1516.
- [37] YU S, CHU W, ZHANG L, et al. Identification of laying-related SNP markers in geese using RAD sequencing [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131572.
- [38] ZHANG K, HAN M, LIU Y, et al. Whole-genome resequencing from bulked-segregant analysis reveals gene set based association analyses for the *Vibrio anguillarum* resistance of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 88:76-83.
- [39] GU X H, JIANG D L, HUANG Y, et al. Identifying a major QTL associated with salinity tolerance in Nile tilapia using QTL-seq[J]. *Mar Biotechnol (N Y)*, 2018, 20(1): 98-107.
- [40] JAGADEESAN R, FOTHERINGHAM A, EBERT P R, et al. Rapid genome wide mapping of phosphine resistance loci by a simple regional averaging analysis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 650.
- [41] BENOWITZ K M, COLEMAN J M, MATZKIN L M. Assessing the architecture of *Drosophila mojavensis* locomotor evolution with bulk segregant analysis[J]. *G3 (Bethesda)*, 2019, 9(5): 1767-1775.
- [42] ZHENG X, ZHU L, HE G. Genetic and molecular understanding of host rice resistance and *Nilaparvata lugens* adaptation[J]. *Curr Opin Insect Sci*, 2021, 45:14-20.
- [43] SCHUMAN M C, BALDWIN I T. The layers of plant responses to insect herbivores[J]. *Annu Rev Entomol*, 2016, 61:373-394.
- [44] LI H P, YANG W J, QU S X, et al. Variation of volatile terpenes in the edible fungi mycelia *Flammulina velutipes* and communications in fungus-mite interactions[J]. *Food Res Int*, 2018, 103: 150-155.

(责任编辑:张震林)