

薛晓杰,杜晓云,盖 艺,等. 基于 GBS 测序开发 SNP 在植物上的应用进展[J]. 江苏农业科学,2020,48(13):62–68.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2020.13.012

基于 GBS 测序开发 SNP 在植物上的应用进展

薛晓杰¹, 杜晓云², 盖 艺¹, 唐 岩², 孙燕霞², 宋来庆², 姜中武^{1,2}

(1. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005; 2. 山东省烟台市农业科学研究院, 山东烟台 265500)

摘要:基因分型测序 (genotyping by sequencing, GBS) 因具有实现相对简单、成本较低、可产生高通量 SNP 的优点而受到青睐。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 因简单、快速、特异性强、稳定遗传、便于检测等特点已成为目前最广泛使用的分子标记之一。本文就利用 GBS 技术开发 SNP 分子标记近年来在亲缘关系评价、重要农艺性状鉴定、遗传多样性研究、遗传图谱构建以及基因定位等方面在国内外的研究进展进行综述,并对其今后的研究提出展望,以期为其在植物上的更广泛应用提供参考。

关键词:SNP 分子标记;GBS 技术;简化基因组测序;遗传图谱构建;QTL 定位;基因定位

中图分类号:S184 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2020)13–0062–07

随着分子生物学的发展,分子标记技术发展迅速,基因组测序技术日渐成为标记开发的重要手段。简化基因组测序 (GBS) 技术近年发展起来。GBS 技术可以捕获基因组重要区域,获得大量单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 且无需已知基因组信息^[1]。目前,SNP 分子标记在果树、蔬菜和花卉等植物上已被成功应用于遗传图谱构建、数量性状基因座 (quantitative trait locus, QTL)、全基因组关联分析、基因定位等方面的研究,GBS 被认为是分子标记辅助选择的最高级应用。但基于 GBS 技术开发 SNP 分子标记的研究在植物上尚无详细报道。本文简要介绍 GBS 技术发展情况,着重概述其近年来在植物上的应用现状和前景,以期为该方法的进一步广泛应用提供参考。

1 SNP 分子标记

在分子育种发展过程中,若干分子标记类型得到开发。基于杂交的第一代分子标记限制性内切酶片段长度多态性 (restriction fragment length

polymorphism, RFLP) 是首次应用于植物基因分型的 DNA 标记。基于 PCR 的第二代分子标记主要包括随机扩增多态性 DNA 标记 (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)、序列特征性扩增区域 (sequence characterised amplified regions, SCAR)、切割的扩增产物多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)、简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 和扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 等,它们均存在不同程度的缺点。基于近年飞速发展的高通量测序技术,第三代分子标记应运而生,其中,SNP 在基因组中最为丰富,被证明更能高效、全面地揭示基因组变异信息。SNP 分子标记由 Lander 提出,指某个碱基对出现替换、缺失或插入而引起的碱基序列改变,最终导致 DNA 序列多样性^[2]。该标记被首次应用于人类基因组计划,检测发现,人类 DNA 序列中每 1.3 bp 即可产生 1 个 SNP^[3],证明 SNP 分子标记在基因组中分布密度较高。SNP 根据位置分布可分为基因编码区 SNP (cSNP)、基因 SNP (iSNP) 和基因周边 SNP (pSNP),通常非编码区变异率高于编码区^[4]。SNP 具有突变频率较低、等位基因较少、遗传稳定性较高和较其他标记分布范围更广等特点,为目前使用较为广泛的分子标记之一。SNP 的开发依赖于第二代测序技术 (next generation sequencing, NGS)。随着测序技术的迅猛发展,诸多植物基因组序列得到公布,扩大了 SNP 分子标记的检测范围。第二代测序技术通常使用高通量测序平台,具有检测速度快、精确度高和高

收稿日期:2020–040–02

基金项目:山东省外专双百计划 (编号:WST2018013);山东省重点研发项目 (编号:2018GHZ005)。

作者简介:薛晓杰 (1994—),女,山东烟台人,硕士研究生,主要从事果树分子与生理技术研究,E-mail: xuexiaojieYT@163.com;共同第一作者:杜晓云 (1979—),女,山西吕梁人,博士,高级农艺师,主要从事果树生物技术育种研究,E-mail: duxiaoyunduzi@163.com。通信作者:姜中武,博士,研究员,主要从事果树育种与栽培技术研究。E-mail: jiangzhongwu@163.com。

通量等特点,又称为高通量测序技术。其中,简化基因组测序(GBS)技术逐渐成为国内外研究热点,最近在植物上的应用迅速发展。

2 GBS 技术

GBS 是利用二代测序技术在作物中发现和分型 SNP 的一种新应用^[5],其原理是使用限制性内切酶(RE)对 DNA 进行酶切,并对酶切片段两端序列进行高通量测序,通过分析获得的 SNP 信息进行基因分型,是一种快速、简单、低成本的基因分型方法。该技术的关键是 GBS 文库构建与生物信息分析,核心是使用 *ApiKI* 限制性内切酶来减少基因组的重复序列。2011 年,Elshire 等首次在玉米和大麦上进行 GBS 试验,分别挖掘出约 200 000 个和 25 000 个序列标记,建立降低基因组复杂性的文库,分析表明,该文库适合大规模样品进行标记筛选^[6]。同为基于酶切的简化基因组测序技术,与限制性位点关联 DNA 测序技术 RAD(restriction – site associated DNA sequencing)相比^[7],GBS 技术步骤更简单,DNA 纯化步骤少,无需进行片段大小选择,可检测到 RAD 技术无法处理的大量缺失基因型,尤其在分析多态性低和重复序列高的物种上更占优势,成本相对低廉。GBS 技术在国内逐渐发展起来,目前已在部分植物上实现高效、大规模的基因组测序。

2.1 GBS 技术主要流程

GBS 技术的重点是 GBS 文库构建。进行 GBS 文库构建或对基因组 DNA 酶切的关键是选择甲基化敏感的 RE 和合适接头。RE 可影响 DNA 片段大小和数量^[8]。选择含有多个悬垂核苷酸的 RE 可有效提高接头与 DNA 的连接效率,并能优先从低拷贝基因区域生成片段^[6]。选取酶切后的片段,用 T_4 DNA 连接酶连接其两端的接头和条形码(barcode)。酶切与连接通常不同时进行,除非选用特殊耐热连接酶。连接结束后,以回收产物为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增可使酶切片段两端产生带有不同接头的核苷酸片段,混合样品,再次回收 DNA 片段并纯化。至此,GBS 文库准备就绪,将混和好的文库使用 Illumina 高通量平台测序;通常该平台的测序错误率随测序序列长度的增加而升高,碱基质量同时受到影响,另外碱基质量还可能受测序试剂和样品等多方面影响,因此,提高测序碱基质量是一个有待解决的问题。为保证分析质量,根据建库样品与

barcode 对应关系,将原始测序数据 Raw Reads 拆分为单样品 Raw Reads,对其进行质控得到过滤后的数据 Clean Reads,根据有无参考基因组分别将 Clean Reads 与参考基因组和构建的参考基因组进行比对,进而进行 SNP 基因型分析。可通过进化树构建、主成分分析、群体遗传结构分析等进行 SNP 信息分析。

2.2 GBS 生物信息学发展

GBS 发展需要生物信息学工具助力海量数据处理。近年来生物信息学分析流程迅速发展,其中几条主要信息流程使用率较高。Sonah 等开发了 IGST – GBS 分析流程,从所产生的序列中读取调用 SNP 和 DENEL,并在 8 种不同大豆基因型上进行了验证^[9]。Glaubitz 等创建了 TASSEL – GBS 数据分析流程,可将原始 GBS 序列数据高效地处理成 SNP 基因型^[10],利用该信息学工具所读取的碱基在后人的使用中被认为几乎无错误^[11]。Melo 等开发了 GBS – SNP – CROP,对可变长度成对末端基因分型的 SNP 和植物种质鉴定,尤其适用于目标种群多样化程度过高情况^[11]。Torkamaneh 等综合比较了 7 条 GBS 生物信息学流程,包括 5 条需要参考基因组的流程(TASSEL – GBS v1&v2、Stacks、IGST 和 Fast – GBS)和 2 条无需参考基因组的从头分析流程(UNEAK 和 Stacks),分析表明,Fast – GBS 分析过程中产生的多态性 SNP 最多,准确性最高^[12]。综合结果表明,运用不同流程分析相同测序技术产生的 SNP 会使得 SNP 高度重叠,然而使用相同流程分析不同测序技术获得的 SNP,重叠相对较少。笔者认为,选择适宜的生物信息学分析流程对于 GBS 分析结果具有较大意义,因此分析流程工具的开发与选择对于预期研究至关重要。

3 基于 GBS 开发 SNP 应用进展

GBS 自开发一来,受到国内外研究者的青睐,目前在植物遗传多样性、遗传图谱构建、QTL 鉴定、基因定位上有较好应用。

3.1 亲缘关系和遗传多样性

研究品种起源和亲缘关系对地区种质资源的保护和利用具有重要参考价值,了解作物的群体结构和遗传多样性对基因关联定位研究和基因组选择至关重要^[13]。利用 GBS 技术产生的 SNP 可有效地对种质资源亲缘关系和遗传多样性进行研究,对此已有前人作过不少研究。

3.1.1 亲缘关系中的应用 王晓柯等利用 GBS 技术对 240 份宽皮柑橘进行基因分型,共获得了 114 200 个高质量的 SNP 位点,主成分分析结果显示,240 份宽皮柑橘被分为 4 大类,系统演化树和主成分分析结果都揭示了不同地理来源和特定形态的宽皮柑橘在遗传水平上存在明显的差异^[14]。Zhao 等利用 GBS 技术、系统基因组学、群体遗传学、转录组学 and 全叶绿体基因组学,推断了核桃属 5 种中国本地物种谱系形成的过程,验证了核桃与水曲柳是一个园艺品种,发现冰川进退是与种群隔离有关的气候变化事件,即使在基因流动和导入的情况下也是如此^[15]。Wu 等利用 GBS 技术对 82 个大叶绣球花品种的遗传多样性和群体结构进行研究,对大叶绣球栽培盘上发现的 5 803 个优质 SNPs 进行了系统发育分析和分子变异分析,得出了大叶绣球的分类方法,证实“Preziosa”是大叶黄连的杂种^[16]。Niu 等利用 GBS 技术对贵州高原起源中心的 415 份茶树样本进行了首次群体遗传分析,揭示了茶树群体的连锁不平衡模式、群体结构和遗传分化,共鉴定出 79 016 个优质 SNP 位点,确定了纯野生型、混合野生型、古代型和现代型 4 个类群,并发现古代型和混合野生型的遗传多样性水平高于纯野生型和现代型^[17]。

3.1.2 遗传多样性中的应用 Taranto 等使用 GBS 技术对辣椒资源进行 SNP 全基因组鉴定,并评估 222 个栽培辣椒基因型子集遗传多样性水平,贝叶斯和层次聚类分析结果表明,基因型在集群中的分布反映了物种的地理起源和果实相关特征^[13]。Pavan 等将 GBS 技术首次应用于甜瓜,通过对收集的 72 份材料的分析,检测到 25 422 个 SNPs,通过遗传结构、主成分和层次聚类分析进行 3 个不同亚群的识别,每个亚群的遗传分析结果揭示了与果实表型和地理起源相关的多样性模式^[18]。Solomon 等通过 GBS 技术对辣椒进行基因分型,第一次全面地分析了埃塞俄比亚辣椒物种的遗传变异,对 142 个辣椒种质资源中 53 284 个高质量 SNP 进行了模型的世系分析和系统发育树、主成分分析,确定了 2 个不同的遗传群体^[19]。周萍萍等利用 GBS 技术对 27 份来自中国的大粒裸燕麦材料进行测序,结合先前发表的包括 6 个六倍体燕麦种在内的 66 份燕麦材料的 GBS 数据进行 SNP 挖掘,并对其进行主成分分析、结构分析以及聚类分析,为栽培六倍体燕麦起源研究提供了理论依据^[20]。

以上研究结果表明,利用 GBS 技术获得的 SNP 群体结构信息可为遗传图谱研究、标记辅助选择和物种起源研究提供基础,证明 GBS 技术在基因分型中被高效运用,可准确地进行亲缘关系和遗传多样性研究,挖掘大量基因组潜在信息,是一个高效可靠的工具。

3.2 遗传图谱和重要农艺性状

遗传图谱也称连锁图谱,是以有多态性的遗传标记为路标,以 2 个位点交换率为图距的图谱,其理论依据为染色体的交换和重组,是分子标记开发、基因鉴定等基因组信息挖掘的基础。GBS 是一种稳定且经济的方法,可以生成通用的全基因组 SNP 数据,适用于在高度杂合的农业物种中对多个群体构建整合连锁图谱^[21]。

数量性状由染色体中的多个基因控制,QTL 的研究可以直接将目标性状定位到相关基因。GBS 技术的发展,成功使基于重组的基因分型来开发物种的 QTL 图谱成为可能。近年来,植物上基于 GBS 技术开发 SNP 的应用主要集中在图谱构建和 QTL 定位方面。

3.2.1 在遗传图谱构建中的应用 Lee 等利用 GBS 技术构建甘蓝型油菜的高分辨率遗传图谱,并对抗性基因进行鉴定,分别获得甘蓝型油菜 2 号和 9 号的 2 个主效 QTL 和 1 个主效 QTL^[22]。Ipek 等使用 GBS 对 125 份橄榄 DNA 样本进行分析,共鉴定出 22 033 个基于转录组的 SNP 标记,其中 3 384 个标记被映射到橄榄基因组中,构建包含 1 个 CAPS、19 个 SSR 和 3 384 个基于转录组的 SNP 标记的饱和遗传图谱^[23]。Jo 等首次采用 GBS 技术对洋葱(无参考基因组)进行 SNP 挖掘,获得 1 851 428 个 SNP,构建洋葱 SNP 遗传图谱^[24]。Li 等通过 GBS 技术构建了基于 SNP 的包含 1 465 个 bin 标记的甘蓝高密度遗传连锁群,其基因组长度为 128 577 cM,相邻 bin 标记间的平均遗传距离为 0.88 cM^[25]。Carrasco 等利用通过 GBS 技术获得的 SNP 构建日本李高密度连锁图谱,指明日本李子和桃子基因组具有高度的共线性^[26]。遗传连锁图谱的构建,将为物种重要农艺性状的 QTL 定位、基因定位和候选基因挖掘提供有用的工具。

3.2.2 重要农艺性状中的应用 Pootakham 等利用 GBS 技术在油棕全基因组范围内构建的遗传图谱上检测到 1 个与果茎相关的 QTL、3 个控制植株生长的 QTL 和 2 个相关候选基因^[21]。赖国荣等利用

通过 GBS 技术获得的 SNP 构建玉米高密度遗传连锁图谱,并结合重组自交系群体籽粒脂肪含量、赖氨酸含量、蛋白质含量和淀粉含量共 4 个营养品质性状的表型数据进行 QTL 定位,共检测到 20 个与营养品质性状相关的 QTL^[27]。Diouf 等利用 GBS 技术从 233 个陆地棉群体中开发出由 5 178 个 SNP 标记组成的第 1 个高密度遗传图谱,鉴定出了与盐度相关性状的 QTL,确定了 8 个集群,发现了 12 个可用于 QTL 精细检测的可能关键基因^[28]。Bhattarai 等通过基于 GBS 的饱和 SNP 连锁图谱对水稻进行基因分型,确定了控制水稻根茎长、鲜根质量、分蘖数和根冠比等的 14 个 QTL,并在 QTL 置信区间内发现了影响短根的重要基因,被认为通过控制细胞增殖和伸长来调节根的生长^[29]。Zhang 等以牡丹品种凤丹和日月锦的杂交后代为母本,利用 GBS 技术检测到 257 335 738 个优质 SNP 标记,根据分布在 5 个连锁群上共包含 3 868 个标记的完整遗传图谱分别测定了控制花数、花瓣长度、花瓣数和花期 4 个表型性状的共 6 个 QTL^[30]。

诸多研究结果表明,基于 GBS 技术开发 SNP 在不同植物中构建遗传图谱并进行 QTL 定位均取得较好的效果,证明 GBS 是一个值得推荐的简化基因组重测序技术。高分辨率的遗传图谱构建和精确的 QTL 检测可以显著缩小植物重要性状的候选基因范围^[31]。

3.3 基因定位

基因定位即测定基因在染色体上的位置,是遗传机理研究的重要环节,对于深入了解植物遗传信息具有重要作用。GBS 技术可以深入到基因组重要区域,获取的基因信息较为准确。Passianotto 等使用 GBS 技术对大豆 188 个植物引种和 5 个品种进行基因型鉴定,发现 3 个与线虫抗性显著相关的基因区域^[32]。郭燕等利用 GBS 技术对 100 份古茶树资源进行全基因组 SNP 挖掘,共鉴定出近 55 万个高质量 SNPs,为后续开展分子标记辅助育种和功能基因位点定位提供了基础^[33]。Gerardo 等构建了由 486 个 SNPs、11 个 SSR 以及 2 个形态标记组成的桃遗传连锁图谱,对可溶性固形物含量、成熟期和果肉粉质 3 个性状进行 QTL 鉴定并确定了与其相关的候选基因^[34]。高美玲等通过 GBS 技术分别对西瓜果形指数大于 1.4 和小于 1.1 的各 10 株个体进行基因分型,在 3 号染色体的 26.80 ~ 27.33 Mb 区段内定位到与西瓜果形有关的基因,并预测了 14

个候选基因^[35]。杨柳等基于 GBS 技术获得枣品种 SNP 标记后,对其进行主成分和遗传多样性分析,并解析枣品种的群体遗传关系,通过基因功能注释和富集分析确定了 6 个参与细胞周期或激素合成调控途径的候选基因^[36]。

通过研究发现,GBS 技术可应用于不同物种 SNP 标记的获取(表 1),在植物遗传多样性分析、遗传图谱构建、重要农艺性状定位以及相关基因定位等中均具有重要意义,这将有助于植物辅助育种和育种保护,也为后续的遗传机理研究奠定了基础。

4 总结与展望

综上所述,近年来国内外基于 GBS 技术发现的 SNP 在植物基因组中分布密集,证实了无需生物基因组信息的 GBS 技术是一个开发 SNP 强有力的工具。未来,随着高通量测序技术、SNP 分子标记技术和生物信息学技术的开发和进步,GBS-SNP 有望开启新一代分子标记与测序技术的重要里程。

目前,GBS-SNP 在作物上应用较广,在小麦、棉花、水稻等作物上的应用研究已趋于先进,而在果树、蔬菜和花卉上的应用研究相对较少且不够完善。利用 GBS 技术开发 SNP 在果树方面的研究仍需不断探索,例如果树童期长、病害种类较多,GBS 可作为一个方便高效选育优良性状的辅助育种工具;芽变选种中存在同名异物、同物异名的现象,GBS 又可作为一个鉴定果树亲缘关系和遗传多样性的有效手段。从国内外研究对比来看,GBS 技术在国内外的使用较为广泛,国内近 3 年以来发展迅速,但总体与国外在研究效率和范围上有一定差距。因此,在今后 GBS 技术应用中,选用合适的限制性内切酶进行 GBS 文库构建、高效的生物信息学流程进行数据分析以及减少测序碱基错误率将变得更为重要。后续研究中,结合代谢组学、转录组学与蛋白质组学进行完善的遗传机理研究,对于我国植物育种保护具有重大意义。

参考文献:

- [1] Kim C, Guo H, Kong W Q, et al. Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs[J]. Plant Science, 2016, 242: 14-22.
- [2] Lander E S. The new genomics: global views of biology[J]. Science, 1996, 274(5287): 536-539.
- [3] Brookes A J. The essence of SNPs[J]. Gene, 1999, 234(2): 177-186.

表 1 基于 GBS 开发 SNP 在植物上的应用

研究领域	物种	参考文献
遗传图谱	樱桃	[37]
	玉米	[38]
	向日葵	[39]
	甘蓝	[40]
	梨	[31]
	油棕	[20]
	桃子	[41]
	苹果	[42]
	小麦	[43]
	甜瓜	[44]
遗传多样性	油菜	[45]
	黑麦草	[46]
	鹰嘴豆	[47]
	洋甘菊	[48]
	梨	[7,49]
	烟草	[50]
	黄瓜	[51]
	怪柳	[52]
	石斛兰	[53]
	谷子	[54]
分子标记	玉米	[55]
	菠菜	[56]
	小麦	[57]
	燕麦	[58]
	紫花苜蓿	[59]
重要农艺性状	粳稻	[60]
	紫苏	[61]
	小麦	[62-63]
	水稻	[64]
	咖啡	[65]
	苹果	[66]
	棉花	[67]
	豇豆	[68]
	鹰嘴豆	[69]
	亚麻	[70]
	豌豆	[71]
	梨	[32]
	桃子	[42]
	向日葵	[72]
	西瓜	[73]

[4] Wang D G, Fan J B, Siao C J, et al. Large - scale identification, mapping and genotyping of single - nucleotide polymorphisms in the human genome[J]. Science,1998,280(5366):1077 - 1082.

[5] He J F, Zhao X, Laroche A, et al. Genotyping - by - sequencing (GBS), an ultimate marker - assisted selection (MAS) tool to

accelerate plant breeding [J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5:484.

[6] Elshire R J, Glaubitz J C, Sun Q, et al. A robust, simple genotyping - by - sequencing (GBS) approach for high diversity species [J]. PLoS One, 2011, 6(5):e19379.

[7] Baird Nathan A, Etter Paul D, Atwood Tressa S, et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers [J]. PLoS One, 2008, 3(10):e3376.

[8] Hwang K, Oh S, Kim K, et al. Genotyping - by - sequencing approaches using optimized two - enzyme combinations in Asian pears (*Pyrus* spp.) [J]. Molecular Breeding, 2019, 39(12):1 - 9.

[9] Sonah H, Bastien M, Iqura E, et al. An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping [J]. PLoS One, 2013, 8(1):e54603.

[10] Glaubitz J C, Casstevens T M, Lu F, et al. TASSEL - GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline [J]. PLoS One, 2014, 9(2):e90346.

[11] Melo A T O, Bartaula R, Hale I. GBS - SNP - CROP: a reference - optional pipeline for SNP discovery and plant germplasm characterization using variable length, paired - end genotyping - by - sequencing data [J]. BMC Bioinformatics, 2016, 17(1):29.

[12] Torkamaneh D, Laroche J, Belzile F. Genome - wide SNP calling from genotyping by sequencing (GBS) data: a comparison of seven pipelines and two sequencing technologies [J]. PLoS One, 2016, 16(8):e0161333.

[13] Taranto F, D'Agostino N, Greco B, et al. Genome - wide SNP discovery and population structure analysis in pepper (*Capsicum annuum*) using genotyping by sequencing [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1):943.

[14] 王小柯, 江 东, 孙珍珠. 利用 GBS 技术研究 240 份宽皮柑橘的系统演化 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(9):1666 - 1673.

[15] Zhao P, Zhou H J, Potter D, et al. Population genetics, phylogenomics and hybrid speciation of Juglans in China determined from whole chloroplast genomes transcriptomes and genotyping - by - sequencing (GBS) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2018, 126:250 - 265.

[16] Wu X B, Alexander L W. Genetic diversity and population structure analysis of big leaf hydrangea using genotyping - by - sequencing [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2019, 144(4):257 - 263.

[17] Niu S Z, Song Q F, Koiwa H, et al. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and population structure analysis of the tea plant (*Camellia sinensis*) from an origin center, Guizhou plateau, using genome - wide SNPs developed by genotyping - by - sequencing [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1):328.

[18] Pavan S, Marcotrigiano A R, Ciani E, et al. Genotyping - by - sequencing of a melon (*Cucumis melo* L.) germplasm collection from a secondary center of diversity highlights patterns of genetic variation and genomic features of different gene pools [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1):53.

- [19] Solomon A M, Han K, Lee J H, et al. Genetic diversity and population structure of Ethiopian *Capsicum* germplasms [J]. PLoS One, 2019, 14 (5) : e0216886.
- [20] 周萍萍, 颜红海, 彭远英, 等. 基于高通量 GBS - SNP 标记的栽培燕麦六倍体起源研究[J]. 作物学报, 2019, 45 (10) : 1604 - 1612.
- [21] Pootakham W, Jomchai N, Ruang - Areerate P, et al. Genome - wide SNP discovery and identification of QTL associated with agronomic traits in oil palm using genotyping - by - sequencing (GBS) [J]. Genomics, 2015, 105 (5 - 6) : 288 - 295.
- [22] Lee J, Izzah N K, Choi B S, et al. Genotyping - by - sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.) [J]. DNA Research, 2016, 23 (1) : 29 - 41.
- [23] Ipek A, Ipek M, Ercisli S, et al. Transcriptome - based SNP discovery by GBS and the construction of a genetic map for olive [J]. Functional & Integrative Genomics, 2017, 17 (5) : 493 - 501.
- [24] Jo J, Purushotham P M, Han K, et al. Development of a genetic map for onion (*Allium cepa* L.) using reference - free genotyping - by - sequencing and SNP assays [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8 : 1606.
- [25] Li X, Kong C C, Yu H L, et al. Identification of a major QTL for seed number per silique in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) using genotyping by sequencing [J]. Euphytica, 2019, 215 (7) : UNSP 133.
- [26] Carrasco B, Gonzalez M, Gebauer M, et al. Construction of a highly saturated linkage map in Japanese plum (*Prunus salicina* L.) using GBS for SNP marker calling [J]. PLoS One, 2018, 13 (12) : e0208032.
- [27] 赖国荣, 张 静, 刘 函, 等. 基于 GBS 构建玉米高密度遗传图谱及营养品质性状 QTL 定位 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25 (9) : 1400 - 1410.
- [28] Diouf L, Pan Z E, He S P, et al. High - density linkage map construction and mapping of salt - tolerant QTLs at seedling stage in upland cotton using genotyping by sequencing (GBS) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18 (12) : 2622.
- [29] Bhattarai U, Subudhi P K. Identification of drought responsive QTLs during vegetative growth stage of rice using a saturated GBS - based SNP linkage map [J]. Euphytica, 2018, 214 (2) : 38.
- [30] Zhang L, Guo D L, Guo L L, et al. Construction of a high - density genetic map and QTLs mapping with GBS from the interspecific F1 population of *P. ostii* 'Fengdan Bai' and *P. suffruticosa* 'Xin Riyuejin' [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 246 : 190 - 200.
- [31] Gabay G, Dahan Y, Izhaki Y, et al. High - resolution genetic linkage map of European pear (*Pyrus communis*) and QTL fine - mapping of vegetative budbreak time [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18 (1) : 175.
- [32] Passianotto A L D, Sonah H, Dias W P, et al. Genome - wide association study for resistance to the southern root - knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in soybean [J]. Molecular Breeding, 2017, 37 (12) : 1 - 11.
- [33] 郭 燕, 乔大河, 杨 春, 等. 基于全基因组 SNP 的贵州久安古茶树遗传关系分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20 (1) : 26 - 36.
- [34] Gerardo N L, Cristóbal B, Catalina P, et al. High - density genetic map and QTL analysis of soluble solid content, maturity date, and mealiness in peach using genotyping by sequencing [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 2579 (17) : 108734.
- [35] 高美玲, 梁晓雪, 刘秀杰, 等. 基于极端个体 GBS 测序初步定位西瓜果形基因 [J]. 分子植物育种, 2020, 18 (10) : 3164 - 3171.
- [36] 杨 柳, 周鹤堂, 薄文浩, 等. 基于选择清除分析鉴定影响枣果实大小的基因 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41 (10) : 30 - 36.
- [37] Guajardo V, Solis S, Sagredo B, et al. Construction of high density sweet cherry (*Prunus avium* L.) linkage maps using microsatellite markers and snps detected by genotyping - by - sequencing (GBS) [J]. PLoS One, 2015, 10 (5) : e0127750.
- [38] Zhou Z, Zhang C, Zhou Y, et al. Genetic dissection of maize plant architecture with an ultra - high density bin map based on recombinant inbred lines [J]. BMC Genomics, 2016, 17 : 178.
- [39] Celik I, Bodur S, Frary A, et al. Genome - wide SNP discovery and genetic linkage map construction in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a genotyping by sequencing (GBS) approach [J]. Molecular Breeding, 2015, 36 (9) : 133.
- [40] Lee J, Izzah N K, Choi B S, et al. Genotyping - by - sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.) [J]. DNA Research, 2016, 23 (1) : 29 - 41.
- [41] Bielenberg D G, Rauh B, Fan S H, et al. Genotyping by sequencing for SNP - based linkage map construction and QTL analysis of chilling requirement and bloom date in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] [J]. PLoS One, 2015, 10 (10) : e0139406.
- [42] Gardner K M, Brown P, Cooke T F, et al. Fast and cost - effective genetic mapping in apple using next - generation sequencing [J]. G3 (Bethesda), 2014, 4 (9) : 1681 - 1687.
- [43] Manickavelu A, Jighly A, Ban T. Molecular evaluation of orphan Afghan common wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces collected by Dr. Kihara using single nucleotide polymorphic markers [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14 (1) : 320.
- [44] Nimmakayala P, Tomason Y R, Abburi V L, et al. Genome - wide differentiation of various melon horticultural groups for use in GWAS for fruit firmness and construction of a high resolution genetic map [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7 : 1437.
- [45] Tanhuanpaa P, Erkkila M, Tenhola - Roininen T, et al. SNP diversity within and among *Brassica rapa* accessions reveals no geographic differentiation [J]. Genome, 2016, 59 (1) : 11 - 21.
- [46] Ashraf B H, Byrne S, Fe D, et al. Estimating genomic heritabilities at the level of family - pool samples of perennial ryegrass using genotyping - by - sequencing [J]. Theoretical and applied Genetics, 2016, 129 (1) : 45 - 52.
- [47] Pavan S, Lotti C, Marcotrigiano A, et al. A distinct genetic cluster in cultivated chickpea as revealed by genome - wide marker discovery and genotyping [J]. Plant Genome, 2017, 10 (2) : 1 - 9.
- [48] Otto L G, Mondal P, Brassac J, et al. Use of genotyping - by -

- sequencing to determine the genetic structure in the medicinal plant chamomile, and to identify flowering time and alpha - bisabolol associated SNP - loci by genome - wide association mapping [J]. BMC Genomics, 2017, 18 (1) : 1 - 18.
- [49] Kumar S, Kirk C, Deng C, et al. Genotyping - by - sequencing of pear (*Pyrus* spp.) accessions unravels novel patterns of genetic diversity and selection footprints [J]. Horticulture Research, 2017, 4 (1) : 17015.
- [50] 蔡露, 杨欢, 王勇, 等. 利用 GBS 技术开发烟草 SNP 标记及遗传多样性分析 [J]. 中国烟草科学, 2018, 39 (5) : 17 - 24.
- [51] Wang X, Bao K, Reddy U K, et al. The USDA cucumber (*Cucumis sativus* L.) collection: genetic diversity, population structure, genome - wide association studies, and core collection development [J]. Horticulture Research, 2018, 5 (1) : 64.
- [52] Lee S R, Gaskin J F, Kim Y D. Molecular diagnosis for a *Tamarix* species from two reclaimed lands along the Yellow Sea in Korea inferred from genome wide SNP markers [J]. Journal of Systematics and Evolution, 2018, 57 (3) : 247 - 255.
- [53] Ryu J, Kim W J, Im J, et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery through genotyping - by - sequencing (GBS) and genetic characterization of *Dendrobium* mutants and cultivars [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 244 : 225 - 233.
- [54] Upadhyaya H D, Vetriventhan M, Deshpande S P, et al. Population genetics and structure of a global foxtail millet germplasm collection [J]. Plant Genome, 2015, 8 (3) : 1 - 13.
- [55] Ertiro B T, Ogugo V, Worku M, et al. Comparison of kompetitive allele specific PCR (KASP) and genotyping by sequencing (GBS) for quality control analysis in maize [J]. BMC Genomics, 2015, 16 (1) : 908.
- [56] Chitwood J, Shie A N, Mou B Q, et al. Population structure and association analysis of bolting, plant height, and leaf erectness in spinach [J]. Hortscience, 2016, 51 (5) : 481 - 486.
- [57] Wiersma A T, Pulman J A, Brown L K, et al. Identification of Pm58 from *Aegilops tauschii* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2017, 130 (6) : 1123 - 1133.
- [58] 董艳辉, 宇凤, 温鑫, 等. 基于高通量测序的藜麦连作根际土壤微生物多样性研究 [J]. 华北农学报, 2019, 34 (2) : 205 - 211.
- [59] Liu X P, Yu L X. Genome - wide association mapping of loci associated with plant growth and Forage production under salt stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8 : 853.
- [60] Zaid I U, Tang W J, Liu E B, et al. Genome - wide single - nucleotide polymorphisms in CMS and restorer lines discovered by genotyping using sequencing and association with marker - combining ability for 12 yield - related traits in *Oryza sativa* L. subsp japonica [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8 : 143.
- [61] Kang Y J, Lee B M, Nam M, et al. Identification of quantitative trait loci associated with flowering time in perilla using genotyping - by - sequencing [J]. Molecular Biology Reports, 2018, 46 (4) : 4397 - 4407.
- [62] Hussain W, Baenziger P S, Belamkar V, et al. Genotyping - by - sequencing derived high - density linkage map and its application to QTL mapping of flag leaf traits in bread wheat [J]. Scientific Reports, 2017, 7 (1) : 1 - 15.
- [63] Bajgain P, Rouse M N, Tsilo T J, et al. Nested association mapping of stem rust resistance in wheat using genotyping by sequencing [J]. PLoS One, 2016, 11 (5) : e0155760.
- [64] de Leon T B, Linscombe S, Subudhi P K. Molecular dissection of seedling salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using a high - density GBS - based SNP linkage map [J]. Rice, 2016, 9 (1) : 52.
- [65] Moncada M D, Tovar E, Montoya J C, et al. A genetic linkage map of coffee (*Coffea arabica* L.) and QTL for yield, plant height, and bean size [J]. Tree Genetics & Genomes, 2016, 12 (1) : 5.
- [66] McClure K A, Gardner K M, Toivonen P M A, et al. QTL analysis of soft scald in two apple populations [J]. Horticulture Research, 2016, 3 : 16043.
- [67] Qi H K, Wang N, Qiao W Q, et al. Construction of a high - density genetic map using genotyping by sequencing (GBS) for quantitative trait loci (QTL) analysis of three plant morphological traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Euphytica, 2017, 213 (4) : 83.
- [68] Ravelombola W, Qin J, Shi A N, et al. Association mapping revealed SNP markers for adaptation to low phosphorus conditions and rock phosphate response in USDA cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] germplasm [J]. Euphytica, 2017, 213 (8) : 14.
- [69] Shimray P W, Bajaj D, Srivastava R, et al. Identifying transcription factor genes associated with yield traits in chickpea [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2017, 35 (5) : 562 - 574.
- [70] Zhang J P, Long Y, Wang L M, et al. Consensus genetic linkage map construction and QTL mapping for plant height - related traits in linseed flax (*Linum usitatissimum* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18 (1) : 1 - 12.
- [71] Gali K K, Liu Y, Sindhu A, et al. Construction of high - density linkage maps for mapping quantitative trait loci for multiple traits in field pea (*Pisum sativum* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18 : 172.
- [72] Talukder Z I, Long Y M, Seiler G J, et al. Introgression and monitoring of wild *Helianthus praecox* alien segments associated with Sclerotinia basal stalk rot resistance in sunflower using genotyping - by - sequencing [J]. PLoS One, 2019, 14 (3) : e0213065.
- [73] Perez - de - Castro A, Esteras C, Alfaro - Fernandez, et al. Fine mapping of *wmv¹⁵⁵¹*, a resistance gene to *Watermelon mosaic virus* in melon [J]. Molecular Breeding, 2019, 39 (7) : 93.