

基于全基因组重测序的SNP分析在作物基因定位中的研究进展

袁金红*, 李俊华*, 黄小城, 李莎, 高武军**

河南师范大学生命科学学院, 河南新乡453007

摘要: 在作物重要性状数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)定位和突变体研究中, 利用传统的遗传标记对目标基因或QTL进行定位, 往往工作量大、周期长, 难以精确定位。近年来, 全基因组重测序(whole genome resequencing, WGR)为从基因组水平开发单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)标记提供了新的技术条件。利用基于WGR的SNP识别、验证和基因型分析与传统分子标记相结合的方法, 能很快挖掘到候选基因和获得导致表型的SNP位点。目前, 通过基于WGR的群体驯化和全基因组关联分析以及对杂交后代进行全基因组SNP基因型分析, 已经成功定位了若干作物的QTL及突变基因。本文就利用基于WGR的SNP分析方法定位作物重要性状QTL和突变基因的研究概况进行综述, 并就该方法在基因/QTL定位上的应用前景进行了探讨和分析。

关键词: 全基因组重测序; 单核苷酸多态性; 基因定位; 数量性状位点

Advance of SNP Analysis Based on Whole Genome Resequencing in Crop Gene Mapping

YUAN Jin-Hong*, LI Jun-Hua*, HUANG Xiao-Cheng, LI Sha, GAO Wu-Jun**

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China

Abstract: In qualitative trait locus (QTL) mapping of important traits and mutant studies, target genes or fine mapped QTLs are sometimes hard to be obtained with traditional approaches, which are laborious and time-consuming. In the past few years, the discovery of single nucleotide polymorphism (SNP) markers at the genome level is enabled by new techniques based on whole genome resequencing (WGR). Combined with SNP discovery, validation and genotyping, the WGR-based QTL mapping approach has the potential to rapidly discover candidate genes and causative SNPs. By WGR-based domestication study and genome-wide association analysis of a collection of individuals, and SNP genotyping in hybrid progeny, many QTLs or mutation sites were successfully mapped in crops. This article reviewed the current advances in QTLs mapping or causative mutations detection of important traits in crops based on WGR and SNP analysis, the prospect of the approach in gene/QTL mapping was discussed and analyzed.

Key words: whole-genome sequencing; SNP; gene mapping; QTL

现代作物遗传育种的重要任务是决定性状的基因/数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)的定位及功能的解析。其中, 对基因/QTL进行精细定位是关键环节之一。目前, 这种精细定位多利用与基因/QTL连锁的分子标记建立的连锁图谱进行。自1980年Botstein等(1980)首次利用限制性片段长度多态性标记构建遗传连锁图谱后, 大量研究利用分子标记进行遗传定位, 也进行了大量的基因/QTL的定位(Bernardo 2008; Fazio等2003)。由于受到分辨率的影响, 这种基于传统遗传连锁图谱的定位方法往往耗时长、费用高, 且难以精细定位(Bernardo 2008; Fazio等2003)。因此, 如何结合现代分子生物学技术开发新的定位方法显得尤为重要。

基因组测序及相关分析技术的快速发展为快速精确的基因/QTL定位提供了数据及技术基础。自2000年模式植物拟南芥的基因组被解析以来, 越来越多种作物的全基因组被测序(崔晓峰2013), 对含野生、栽培亚种等的种质资源群体进行全基因组重测序(whole genome resequencing, WGR), 利

收稿 2015-06-19 修定 2015-08-10

资助 人力资源与社会保障部留学人员科技活动项目择优资助、教育部留学回国人员科研启动基金、河南联合基金(U1504319)和河南师范大学博士启动课题(qd14171和qd12127)。

* 并列第一作者。

** 通讯作者(E-mail: gaowujun1@163.com; Tel: 0373-3323329)。

用单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)等现代分子标记构建基因组遗传变异图谱, 已成为研究基因组多样性、获得驯化选择区域并筛选重要性状关键基因的一个重要的研究内容(Huang等2012b; Jiao等2012; Lin等2014; Qi等2013)。而且, 通过WGR结合混合分组分析法(bulked segregate analysis, BSA)可高效检测通过双亲杂交建立的后代群体(以下简称双亲群体)中导致表型变异的QTL和突变位点(Abe等2012; Takagi等2013)。在过去的几年中, 基于WGR进行QTL和突变基因定位的许多研究方法被开发出来, 以更好地挖掘重测序数据中蕴含的信息。SNP是基因组DNA序列上广泛存在的最基本的变异形式。植物基因组中平均每数百bp存在一个SNP(Huang等2010; Qi等2013; Schmid等2003)。基于WGR策略可获得目的个体全基因组的基因型信息, 识别大量的SNP分子标记, 有利于全基因组遗传标记的开发、基因型鉴定和基因/QTL定位, 对于作物分子辅助育种和基因组学研究具有重要的作用。本综述讨论了近几年基于WGR和SNP分析对候选突变基因的挖掘和作物重要性状QTL的定位的影响。

1 SNP为基因精细定位和分子辅助育种提供了有力工具

高密度的遗传图谱有利于进行基因/QTL的精细定位。SNP为基于测序的高密度遗传图谱的构建提供了有力工具(Huang等2009; Stange等2013; Xie等2010)。在一些参考基因组序列已经公布的重要作物中, SNP分子标记得到了较好的开发。在水稻和黄瓜中, 基于WGR获得了全基因组水平上数百万个SNP标记(Huang等2009, 2010; Qi等2013), 构建了全基因组遗传变异图谱, 一些重要性状基因/QTL陆续被定位或克隆, 如水稻产量相关的43个QTL(Gao等2013)、黄瓜果实长度和苦味基因(Qi等2013; Shang等2014)。Yu等(2011)对241个重组自交系株系进行了约0.06倍的重测序, 完成了粒长和粒宽的两个主效QTL及一个着色相关的QTL的精确定位。他们利用多年的田间试验数据, 发现基于SNP的遗传图谱可检测到更多的QTL, 特别是有关粒重的QTL, 且定位位置更精确。

将SNP和传统分子标记相结合用于分子辅助育种, 由于相较于以前分辨率大大提高, 有助于更有效的利用遗传资源(Cabezas等2011)。作物基因

组DNA序列携带了作物全部的遗传信息, 通过WGR将测序数据与参考基因组进行序列比对, 可在基因组水平上分析作物最基本的SNP遗传变异信息, 在此基础上开发的分子标记数量丰富。如果其中某一分子标记和目标表型相连锁, 将该分子标记用于辅助育种, 有助于从大的育种群体中选择出想要的株系。在谷类作物中, 基于基因组DNA序列开发的SNP分子标记提高了得到期望获得的基因型的准确性, 节约了时间和成本, 促进了育种的效率(Paux等2012; Varshney等2006, 2007)。

2 WGR促进了驯化基因定位及全基因组关联分析

基于SNP等海量的变异, 获得栽培品种与野生祖先种或野生近缘种间基因组水平上的DNA多态性信息, 促进了群体结构分类及遗传多样性研究, 有利于分析群体的分化特点及驯化受选择区域(Huang等2012a; Jiao等2012; Lin等2014; Qi等2013)。通过分析作物驯化的遗传瓶颈、人工选择对“驯化基因”核苷酸多态性的选择性清除作用等可以确定栽培品种基因组内受选择的驯化区域, 并发现栽培品种间具有差异的分化区域。这些区域可作为栽培品种重要性状基因的候选区域(Qi等2013), 有助于发现和挖掘候选基因, 以及开发与目标基因紧密连锁的分子标记, 为分子辅助育种提供强有力的帮助。通过WGR分析群体的分类结构和遗传多样性(Huang等2012a; Jiao等2012; Lin等2014; Qi等2013), 从亚群内鉴定出连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)区域, 挑选合适的标签SNP, 可进行全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)。这种以WGR为基础的群体遗传学研究已在作物中得到广泛应用(Huang等2012a; Jiao等2012; Lin等2014; Qi等2013)。

GWAS旨在分析自然群体中全基因组水平上的高密度分布位点的基因型(通常是单个SNP或者SNP单倍型)与表型统计意义上关联性。利用群体确定某一表型的候选基因时, 以往方法通常涉及选择一些遗传标记与表型进行关联分析, 在对相对简单路径中的候选基因或者明显影响表型的候选基因进行群体定位时有着成功的应用(Myles等2009)。但因所选候选基因和遗传标记常带有猜测性质, 难以深入了解表型的遗传基础。基于全基因组水平开发的大量遗传标记(典型的如SNP)作为标记资源为GWAS分析奠定了基础。首先, 在全

基因组水平上,对群体中具有遗传多样性的个体进行基因型分析。然后,根据在依次排列的基因座位上具有相同SNP单倍型(haplotype)或者单个SNP的情况对基因型进行分类。最后,比较每个单倍型(或等位基因)的表型值分布情况,并利用统计方法进行LD检验,从而最终获得导致目标性状的功能性变异或者数量性状核苷酸(Myles等2009; Rafalski 2010)。

GWAS利用基因组上足够的遗传标记对群体进行基因分型,容易选择到一个或多个与功能性变异处于强LD的遗传标记。基于WGR,对含950个品种的水稻群体进行GWAS分析,发现了数十个新的与开花和籽粒性状关联的位点(Huang等2012b)。在黄瓜中,对115份黄瓜核心种质资源进行WGR,通过GWAS分析迅速发现了黄瓜苦味物质葫芦素C合成基因簇(Shang等2014)。GWAS不需要人工构建群体,相较而言是更“自然”的实验。广泛的遗传材料可同时考察多个性状大多数QTL的关联位点及其等位变异,不受传统的“双亲本”范围的限制。GWAS定位基因/QTL定位的分辨率取决于LD随物理距离衰减的程度。自然群体在其形成历史中,经历了许多轮重组,LD衰减存在于很短的距离内,因而保证了GWAS定位更高的准确性(Myles等2009)。

3 基于WGR获取基因型用于双亲群体QTL定位有效性高

经典的方法利用“双亲”构建作图群体,并借助分子标记对后代个体进行基因型分类,分析表型与基因型的关系,从而预测目标性状的QTL位点与分子标记的遗传连锁关系及遗传距离(席章营等2005)。自2008年以来,测序成本降低了100倍以上(Niedringhaus等2011),使基于基因组测序直接获得目标个体的基因型成为可能。Huang等(2009)在对150份水稻重组自交系利用基于PCR的分子标记和WGR两种策略获取水稻基因型比较中发现,在基因型获取速度上,WGR比基于PCR的分子标记快约20倍,确定重组断点精确30多倍。

为更好挖掘WGR数据蕴含的可用于定位QTL的大量信息,利用SNP分析目的个体基因型的研究方法得到了较快的发展(Huang等2009; Takagi等2013; Xie等2010)。Huang等(2009)对水稻重组自交系进行了0.02倍的全基因组重测序,由于得到的序列稀疏且容易错误,他们引入了bin(将相邻的未

发生重组的多个SNP归并为一个bin)作为基因分型的单位,构建了bin遗传图谱,并将一个株高主效QTL定位在100 kb区域,该区域含水稻“绿色革命”基因。Xie等(2010)利用一种不依赖亲本的基因型分型方法,通过对238个株系进行约0.055倍的低覆盖度测序,将水稻粒宽QTL定位在200 kb范围内。Takagi等(2013)开发了QTL-seq方法,成功定位了抗稻瘟病基因和种子活力基因等重要性状基因。利用该方法,在黄瓜中迅速将与开花时间相关的QTL定位在890 kb的区间,分析发现*Csa1G651710*很可能为其候选基因(Lu等2014)。

4 WGR的应用推动了突变位点的鉴别

在用于诱变的亲本株系全基因组序列已知的情况下,WGR方法快速鉴别出了导致自然突变体和人工诱变突变体中的突变基因(Cuperus等2010; Schneeberger等2009)。然而,现已证实用于突变位点筛选鉴定的材料并非必须源于全基因组序列已知的株系(Uchida等2011)。通过与哥伦比亚型拟南芥参考基因组进行比对,Laitinen等(2010)利用深度WGR成功地在野生拟南芥自然诱发突变体中筛选到功能性单碱基变异位点。研究发现同时出现的其它突变或者背景多态性会使人们难以鉴别突变位点,这种现象在不易自交的物种中易出现(Sarin等2008)。因此建议对用于诱变的亲本个体也进行测序。

结合SNP分析对有限的个体进行低倍WGR也能获得高分辨率的遗传图谱,有助于快速、准确定位突变基因,大大节约时间和成本(Schneeberger等2009; Schneeberger和Weigel 2011)。基于WGR的分析方法由于组合临近标记的信息,有效地整合了多个重组染色体的信息,而不是仅分析单个标记位点。因此,在对水稻重组自交系WGR的研究中,虽然覆盖率低(约0.02倍),但重组断点的分辨率可达40 kb(Huang等2009)。在已建立了分离群体的情况下,定位基因或QTL的过程(共约8 d)包括DNA提取(1 d)、文库制备和验证(4 d)、测序(2 d)以及数据分析(2 d),相较之前的方法几乎快了一个数量级(Schneeberger和Weigel 2011)。利用基因组数据,结合参考基因组和基因型分析工具,定位克隆一个基因从之前一年需要5个人降低到一年只需要1个人(Jander等2002; Schneeberger和Weigel 2011)。

传统的方法作图群体越大,重组个体数分析

得越多,对突变位点的定位越精确。然而,基于WGR的方法用于基因型分析的样本数显著减少。利用SHOREmap法仅需分析数十个植株(Schneeberger等2009)。并且,在Abe等(2012)开发的名为MutMap的方法中,利用BSA方法结合WGR的策略不需要分析后代每个个体的全基因组基因型,只需对野生型或突变表型个体的混合基因池进行分析。该方法不需要构建高级作图群体,而是利用易于构建的F₂分离群体构建混合基因池,在分析SNP变异获得混合池基因型的基础上,通过SNP-index这一参数的峰值位置来获得突变位点所在区域。而且,大多数突变位点或影响阅读框,或影响剪切位点,这有利于在后期确认突变位点时对位点进行筛选。BSA方法结合WGR策略在突变基因定位中的成功应用(Abe等2012; Fekih等2013; Takagi等2015; Zhou等2015),促进了对突变基因和导致表型的序列变异的鉴别,有助于深入了解表型变异的遗传基础。

5 结语

第二代测序技术的WGR已经对基因/QTL定位产生了显著的影响。GWAS减少了通过杂交方法产生大量后代的必要,可迅速定位在自然群体中普遍存在的等位基因。虽然几乎所有的主要作物的基因组序列已经完成测序或在计划测序之中,但是并非所有育种家感兴趣的基因或等位基因在栽培物种的基因池中均能发现。例如参与重要代谢产物合成通路的基因(Graham等2010; Shang等2014)或抗病基因(Cai等1997)。倍性的阻碍常常限制这些等位基因通过常规的方法从邻近亲缘种渐渗过来,虽然利用广泛的杂交可能达到目的,但它却是一个复杂的策略。然而,由于关联定位的检测能力依赖于QTL效应的大小和等位基因频率的分布情况,GWAS对稀有基因的检测可信度低(Rafalski 2010)。在稀有基因定位和上位性互作的研究中,目前还没有方法替代利用双亲群体进行的连锁定位。

传统的遗传定位方法将双亲群体作为作图群体,利用高分辨率的遗传标记构建连锁遗传图谱,有利于基因/QTL的定位。基于基因组测序和WGR促进了SNP等更高分辨率的分子标记的开发(Huang等2010; Qi等2013),为建立完整、高密度的分子遗传图谱提供了契机。GWAS方法利用“自然

群体”进行研究,传统方法利用双亲群体进行连锁分析,两者具有互补性,在基因/QTL定位应用中具有广泛的应用前景(Huang等2010)。而且,基于WGR可获目的个体全基因组水平上的基因型(Huang等2009),WGR结合BSA策略不但在突变基因定位中成功应用(Abe等2012; Schneeberger等2009),也延伸到QTL在双亲群体的定位,加快了水稻和黄瓜一些重要性状QTL的定位进程(Lu等2014; Takagi等2013)。将基因组学方法与传统的遗传定位方法相结合将促进基因/QTL的定位和克隆。

在作物中,基于WGR的一些突变基因定位方法如SHOREmap (Schneeberger等2009)、MutMap (Abe等2012)、MutMap+ (Fekih等2013)较传统方法更直接更高效,且易于延伸至自然变异种。最近,Takagi等(2015)利用MutMap技术快速鉴别出了导致突变体*hst1*耐盐性的功能缺失性变异,在此基础上利用*hst1*仅用两年时间就选育出了新的耐盐株系资源。由此可见,未来在具有足够多变异性状个体杂交的基础上,基于WGR的SNP分析将更有利于突变基因/QTL的定位,也将更有利于新型种质资源的选育。

参考文献

- 崔晓峰(2013). 2008~2013年间植物生物学领域国内外重要研究进展比较. 植物生理学报, 49 (6): 515~539
- 席章营,朱芬菊,台国琴,李志敏(2005). 作物QTL分析的原理和方法. 中国农学通报, 21 (1): 88~92
- Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M et al (2012). Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. Nat Biotechnol, 30 (2): 174~178
- Bernardo R (2008). Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. Crop Sci, 48 (5): 1649~1664
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet, 32 (3): 314~331
- Cabezas J, Ibáñez J, Lijavetzky D, Vélez D, Bravo G, Rodríguez V, Carreño I, Jermakow A, Carreño J, Ruiz-García L et al (2011). A 48 snp set for grapevine cultivar identification. BMC Plant Biol, 11: 153
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff H, Sandal N, Marcker K, Klein-Lankhorst R, Salentijn E, Lange W, Stiekema W et al (1997). Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science, 275 (5301): 832~834
- Cuperus J, Montgomery T, Fahlgren N, Burke R, Townsend T, Sullivan C, Carrington J (2010). Identification of *MIR390a* precursor processing-defective mutants in Arabidopsis by direct genome sequencing. Proc Natl Acad Sci USA, 107 (1): 466~471
- Fazio G, Staub J, Stevens M (2003). Genetic mapping and QTL analy-

- sis of horticultural traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet*, 107 (5): 864–874
- Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H et al (2013). MutMap+: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS ONE*, 8 (7): e68529
- Gao Z, Zhao S, He W, Guo L, Peng Y, Wang J, Guo X, Zhang X, Rao Y, Zhang C et al (2013). Dissecting yield-associated loci in super hybrid rice by resequencing recombinant inbred lines and improving parental genome sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (35): 14492–14497
- Graham I, Besser K, Blumer S, Branigan C, Czechowski T, Elias L, Guterman I, Harvey D, Isaac P, Khan A et al (2010). The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. *Science*, 327 (5963): 328–331
- Huang X, Feng Q, Qian Q, Zhao Q, Wang L, Wang A, Guan J, Fan D, Weng Q, Huang T et al (2009). High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. *Genome Res*, 19 (6): 1068–1076
- Huang X, Kurata N, Wei X, Wang Z, Wang A, Zhao Q, Zhao Y, Liu K, Lu H, Li W et al (2012a). A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature*, 490 (7421): 497–501
- Huang X, Wei X, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Li C, Zhu C, Lu T, Zhang Z et al (2010). Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat Genet*, 42 (11): 961–967
- Huang X, Zhao Y, Wei X, Li C, Wang A, Zhao Q, Li W, Guo Y, Deng L, Zhu C et al (2012b). Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. *Nat Genet*, 44 (1): 32–39
- Jander G, Norris S, Rounsley S, Bush D, Levin I, Last R (2002). *Arabidopsis* map-based cloning in the postgenome era. *Plant Physiol*, 129 (2): 440–450
- Jiao Y, Zhao H, Ren L, Song W, Zeng B, Guo J, Wang B, Liu Z, Chen J, Li W et al (2012). Genome-wide genetic changes during modern breeding of maize. *Nat Genet*, 44 (7): 812–815
- Laitinen R, Schneeberger K, Jelly N, Ossowski S, Weigel D (2010). Identification of a spontaneous frame shift mutation in a nonreference *Arabidopsis* accession using whole genome sequencing. *Plant Physiol*, 153 (2): 652–654
- Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X et al (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet*, 46 (11): 1220–1226
- Lu H, Lin T, Klein J, Wang S, Qi J, Zhou Q, Sun J, Zhang Z, Weng Y, Huang S (2014). QTL-seq identifies an early flowering QTL located near *Flowering Locus T* in cucumber. *Theor Appl Genet*, 127 (7): 1491–1499
- Myles S, Peiffer J, Brown PJ, Ersoz ES, Zhang Z, Costich DE, Buckler ES (2009). Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *Plant Cell*, 21 (8): 2194–2202
- Niedringhaus TP, Milanova D, Kerby MB, Snyder MP, Barron AE (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal Chem*, 83 (12): 4327–4341
- Paux E, Sourdille P, Mackay I, Feuillet C (2012). Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding. *Biotechnol Adv*, 30 (5): 1071–1088
- Qi J, Liu X, Shen D, Miao H, Xie B, Li X, Zeng P, Wang S, Shang Y, Gu X et al (2013). A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nat Genet*, 45 (12): 1510–1515
- Rafalski JA (2010). Association genetics in crop improvement. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 174–180
- Sarin S, Prabhu S, O'Meara M, Pe'er I, Hobert O (2008). *Caenorhabditis elegans* mutant allele identification by whole-genome sequencing. *Nat Methods*, 5 (10): 865–867
- Schmid K, Sørensen T, Stracke R, Törjék O, Altmann T, Mitchell-Olds T, Weisshaar B (2003). Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res*, 13 (6A): 1250–1257
- Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Juul T, Petersen AH, Nielsen KL, Jørgensen JE, Weigel D, Andersen SU (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat Methods*, 6 (8): 550–551
- Schneeberger K, Weigel D (2011). Fast-forward genetics enabled by new sequencing technologies. *Cell*, 16 (5): 282–288
- Shang Y, Ma Y, Zhou Y, Zhang H, Duan L, Chen H, Zeng J, Zhou Q, Wang S, Gu W et al (2014). Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. *Science*, 346 (6213): 1084–1088
- Stange M, Utz H, Schrag T, Melchinger A, Würschum T (2013). High-density genotyping: an overkill for QTL mapping? Lessons learned from a case study in maize and simulations. *Theor Appl Genet*, 126: 2563–2574
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S et al (2013). QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J*, 74 (1): 174–183
- Takagi H, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Uemura A, Yaegashi H, Obara T, Oikawa K, Utsushi H, Kanzaki E et al (2015). MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nat Biotechnol*, doi: 10.1038/nbt.3188
- Uchida N, Sakamoto T, Kurata T, Tasaka M (2011). Identification of EMS-induced causal mutations in a non-reference *Arabidopsis thaliana* accession by whole genome sequencing. *Plant Cell Physiol*, 52 (4): 716–722
- Varshney R, Hoisington D, Tyagi A (2006). Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends Biotechnol*, 24 (11): 490–499
- Varshney RK, Langridge P, Graner A (2007). Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley. *Adv Genet*, 58: 122–155
- Xie W, Feng Q, Yu H, Huang X, Zhao Q, Xing Y, Yu S, Han B, Zhang Q (2010). Parent-independent genotyping for constructing an ultrahigh-density linkage map based on population sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (23): 10578–10583
- Yu H, Xie W, Wang J, Xing Y, Xu C, Li X, Xiao J, Zhang Q (2011). Gains in QTL detection using an ultra-high density SNP map based on population sequencing relative to traditional RFLP/SSR markers. *PLoS ONE*, 6 (3): e17595
- Zhou Q, Wang S, Hu B, Chen H, Zhang Z, Huang S (2015). An *AC-CUMULATION AND REPLICATION OF CHLOROPLASTS 5* gene mutation confers light green peel in cucumber. *J Integr Plant Biol*, doi: 10.1111/jipb.12355