

BSA技术与昆虫杀虫剂抗性基因定位

孟晨, 仇鑫, 陈斌, 张玉娟*

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所媒介昆虫重庆市重点实验室, 重庆 401331)

摘要: 使用杀虫剂进行病虫害防控是有效防治虫媒疾病的重要方式之一, 但大规模使用杀虫剂导致昆虫出现了不同程度的抗性。随着高通量测序技术的发展和分子标记的应用、大量物种全基因组测序的完成, 利用双亲分离后代群体中具有极端表型的个体构建混池进行测序, 通过比较不同混池之间的多态性并结合表型信息, 从而定位目的基因的混合群体分离分析(bulked segregant analysis, BSA)技术, 因其简单、高效的特点得到了快速广泛的应用。采用BSA技术揭示杀虫剂抗性产生的分子机制, 对抗药性产生风险的有效评估以及新型杀虫剂的改良开发具有重要意义。本文就近年来BSA技术的发展和昆虫杀虫剂抗性分子机理的相关研究进行综述, 并对该技术在昆虫杀虫剂抗性研究中的意义和应用前景进行了总结与展望。

关键词: 混合群体分离分析技术; 单核苷酸多态性标记; 杀虫剂抗性; 基因定位

BSA technology and mapping of insect insecticide resistance genes

MENG Chen, QIU Xin, CHEN Bin, ZHANG Yujuan*

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Institute of Entomology and Molecular Biology,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: The use of pesticides for pest control is one of the important ways to effectively control insect-borne diseases, but the large-scale use of pesticides has led to the emergence of different degrees of resistance in insects. With the development of high-throughput sequencing technology, the application of molecular markers, and the completion of whole-genome sequencing of a large number of species, individuals with extreme phenotypes in the parental segregation progeny population are used to construct mixed pools for sequencing. By comparing the polymorphisms between different mixed pools, bulked segregant analysis (BSA) technology, which combines phenotypic information to locate target genes, has been rapidly and widely used because of its simplicity and high efficiency. The use of BSA technology to reveal the molecular mechanism of pesticide resistance, effective assessment of the risk of pesticide resistance, the improvement and development of new pesticides are of great significance. In this paper, the development of BSA technology and related research on the molecular mechanism of insect insecticide resistance in recent years are reviewed, and the significance and application prospect of this technology in insect insecticide resistance research are summarized and prospected.

Key Words: BSA technology; single nucleotide polymorphism; insecticide resistance; gene mapping

收稿日期: 2022-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872262, 31672363, 31871274)

第一作者: E-mail: 1094828226@qq.com

*通信作者: E-mail: zhangyj@cqnu.edu.cn

传统基因定位运用图位克隆和遗传作图的方式, 通过设计大量遗传杂交实验, 计算基因之间的重组率, 绘制遗传图谱, 确定基因相对距离。该方法需要收集连续多代的重要动植物表型数据, 不仅成本高、耗时长, 而且工作量大、效率低, 被定位的基因常常是具有重要经济价值的动物基因或者是具有重要农艺性状的植物基因。随着分子标记技术和高通量测序技术的发展, 越来越多重要性状的复杂遗传机制有待被阐明。混合群体分离分析(bulked segregant analysis, BSA)技术是通过设计适当的遗传群体, 将亲本间差异的极端表型关联分子标记, 利用分子标记在子代间的重组, 快速定位质量性状位点和数量性状位点基因, 阐明遗传机制的一种重要方法。本文主要综述了几种常见BSA技术的定位原理及其在昆虫杀虫剂抗性基因定位中的应用, 以期为其他昆虫基因定位相关研究提供理论基础。

1 BSA技术概述

BSA技术是一种通过选取亲本后代具有表型差异的两个群体构建混池, 比较混池间的等位基因频率差异, 定位性状关联基因的方法。该方法首先从一对具有表型差异的亲本分离后代中选取出极端表型个体, 分别提取等量DNA组成混池, 通过测序比对, 计算两混池间的差异等位基因频率, 分析分子标记与基因的连锁程度, 以定位候选基因。BSA技术按照其应用类型可分为BSA-seq、突变位点图谱(MutMap)和混合群体分离结合RNA测序(bulked segregant RNA-seq, BSR-seq)^[1]。可与BSA技术结合用于基因定位的分子标记有多种, 常用的有简单重复序列标记(simple sequence repeats, SSR)^[2]、单核苷酸多态性标记(single nucleotide polymorphism, SNP)^[3]等。

BSA技术既可以用于定位质量性状(qualitative character)位点基因, 也可以用于定位数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)基因。以F₂群体为例, 如果我们感兴趣的基因是由一对或几对质量性状基因控制, 那么F₂群体的表型应呈现间断分布, 运用卡方检验验证符合孟德尔定律, 呈现(3:1)ⁿ的比例; 如果我们感兴趣的基因由数量性状位点控制, 那么F₂群体的表型应呈现连续的近似正态

分布。

BSA技术已被广泛用于作物遗传育种中涉及的各种复杂的基因定位问题。例如定位小麦基础免疫毒性R基因*H6*、*Hdic*和*H5*^[4]; 鉴定与南瓜疫霉根腐病抗性和冠腐病抗性相关的QTL^[5]; 定位花生红皮隐性候选基因^[6]; 研究大白菜叶状头形成的分子机制, 帮助大白菜优良抽穗类型的选育^[7]; 培育具有产量高、抗倒伏和机械收获适应性等特点的矮小紧凑甘蓝型油菜^[8]等。

1.1 BSA技术结合SSR标记定位技术

SSR是一类由1~6个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列, 主要分布在高等生物的基因组中, 根据重复序列在基因组中的分布形式可将其分为串联重复序列和散布重复序列^[9]。Lim等^[10]利用与紫苏作物叶片和种子性状相关的SSR标记, 选取F₃群体中具有极端表型的个体构建混池, 在亲本和两个池之间进行序列比对和标记多态筛选。通过性状和标记之间的连锁进行基因型分析成功定位到两个与种皮颜色相关的SSR标记——*KNUPF11*和*KNUPF29*; 一个与种子大小相关的SSR标记*KNUPF29*; 以及三个与种子硬度相关的SSR标记*KNUPF12*、*KNUPF16*和*KNUPF42*。虽然利用SSR标记进行基因定位简单高效, 但SSR标记不能位于功能基因的内部, 所以有时还需结合单核苷酸多态性标记进行基因定位。

1.2 BSA技术结合SNP标记基因定位技术

SNP是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异引起的DNA序列多态性, 包括置换、颠换、缺失和插入。SNP在基因组上分布广泛, 结合高通量测序已成为如今进行基因定位的重要手段^[11]。

从F₂分离群体中选取极端性状个体分别提取等量DNA组成高(high-bulk)低(low-bulk)混池, 并将两个混池和亲本分别进行高通量测序, 再比对到参考基因组上, 获得子代突变信息, 计算各混池与亲本不同基因型所占的比例, 记作SNP-index。在感兴趣的QTL位点附近区域, SNP-index应为1, 离目标位点越近, SNP-index越接近1, 其余与目标性状无关的区域, SNP-index在0.5左右。通过将两个混池的SNP-index相减得到 Δ SNP-index, Δ SNP-index接近1的位置就是目标基因所在

区间^[12](图1A)。SNP-index计算公式^[12]如下:

$$SNP-index = \frac{\text{The Alternate Allele}}{\text{Total Read Depth}}$$

The Alternate Allele是测序得到的染色体某个位置的突变等位基因频率, Total Read Depth是在该位置的总测序深度。

噪音的存在使QTL定位变得困难, Takagi等^[12]提出基于滑窗模拟的QTL-seq方法, 即在给定大小和步长的滑窗内计算平均 Δ SNP-index, 根据遗传群体的类型和大小设置不同的模拟次数, 模拟的极端分位数被用于估计置信区间, 真实数据被滑动窗口平均, 超过置信区间的区域存在假定QTL。计算公式如下:

$$\Delta SNP-index = SNP-index_{\text{HighBulk}} - SNP-index_{\text{LowBulk}}$$

Magwene等^[13]根据实际观察和预期等位基因深度计算每个SNP的修正G-value(G'), 该方法在降噪的同时还解决了SNP连锁不平衡的问题。由于G'接近对数正态分布, 因此可以使用G'的零分布的非参数估计来估计每个SNP的P值。利用G'的自然对数计算出中位数绝对偏差, 再通过Hampel规则排除离群值, 最后使用Benjamini-Hochberg进行P值校正。计算公式如下:

$$G = 2 * \sum \eta_i \ln(\text{obs}(n_i) / \exp(n_i))$$

$$\exp(n_1) = (n_1 + n_2)(n_1 + n_3) / (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$$

$$\exp(n_2) = (n_2 + n_1)(n_2 + n_4) / (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$$

$$\exp(n_3) = (n_3 + n_1)(n_3 + n_4) / (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$$

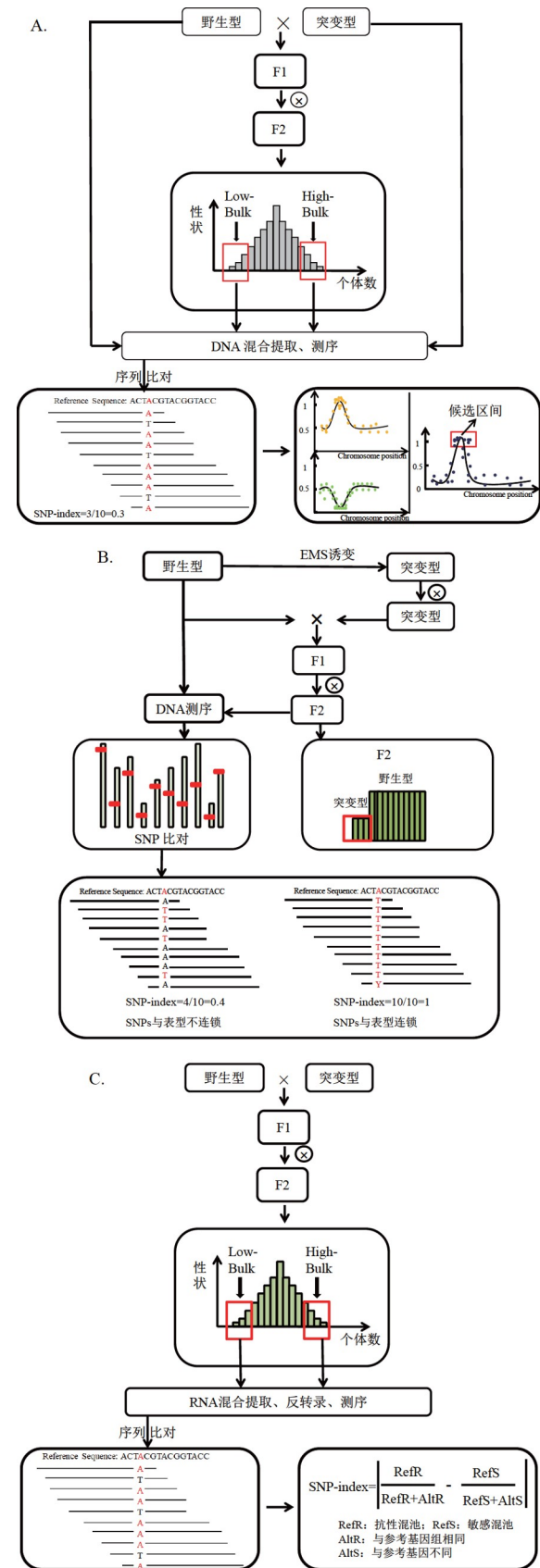
$$\exp(n_4) = (n_4 + n_2)(n_4 + n_3) / (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$$

n_1 代表该位置上Highbulk的参考等位基因频率, n_2 代表该位置上Lowbulk的参考等位基因频率, n_3 代表该位置上Highbulk的替代等位基因频率, n_4 代表该位置上Lowbulk的替代等位基因频率。

欧式距离^[14](Euclidean distance, ED)也是常用于去除背景噪音、结合SNP-index定位候选基因的方法之一, 在没有亲本的情况下也可以采用该方法进行基因定位。两个极端性状子代混池只在控制性状的基因及其连锁位点出现差异, 所以通过各个位点欧式距离的计算, 我们可以判断哪些位点更可能是控制对应性状的QTL。计算公式如下:

$$ED = \sqrt{(A_{mut} - A_{wt})^2 + (C_{mut} - C_{wt})^2 + (G_{mut} - G_{wt})^2 + (T_{mut} - T_{wt})^2}$$

其中, A_{mut} 是指该位点在Highbulk中的A碱基



A: BSA; B: MutMap; C: BSR

图1 BSA、Mutmap和BSR技术路线图

频率, Awt是指该位点在Lowbulk中的A碱基频率, 其余同理。

1.3 Mutmap定位技术

作为BSA技术的重要发展, 突变位点图谱是通过对野生型亲本和突变体混池进行测序分析, 定位化学诱变个体隐性突变基因的基因定位技术^[15]。MutMap技术首先使用诱变剂诱变野生型亲本获得突变体, 突变体再自交, 得到纯合突变体亲本。然后将突变体亲本与野生型亲本回交后, 再自交, F₂出现野生型表型群体和突变体表型群体两种表型后代。将野生型亲本和突变体混池进行测序分析, 计算SNP在突变体混池和野生型混池出现的频率, 分析突变体基因型所占的比例(SNP-index)。在突变体混池中, 只有与突变体表型关联的SNP及其紧密连锁的SNP会出现100%的突变体类型, 并且离关联SNP越近突变体类型SNP的纯合度越高, 即突变基因所在位置SNP-index等于1, 而其他的无关位点, SNP-index接近0.5(图1B)。

Abe等^[15]使用诱变剂诱变野生型绿色叶片水稻植株(Hitomebore), 得到浅色叶片突变株Hit1917-pl1和Hit0813-pl2, 将两个突变株与亲本回交后分别进行MutMap定位。最终将目标性状分别定位到10号染色体和1号染色体上, 其中10号染色体的位置包含一个编码叶绿素a加氧酶的目标基因*OsCAOI*, 该基因的敲除突变体叶绿素含量低于野生型。

1.4 BSA技术结合转录组测序定位技术

BSA技术结合转录组测序技术通过选取两个极端表型混池, 利用转录组测序得到SNP位点, 进行连锁分析和基因定位(图1C)^[16]。位于编码区的功能基因通常是基因定位中最受关注的目的基因, 而真核生物基因间区包含大量重复序列, 对测序和分析造成干扰, 于是产生了结合RNA测序来进行基因定位的BSR技术, 大量的转录组测序数据在提供变异位点的同时可以进一步辅助筛选差异基因。

Liu等^[17]在研究玉米时发现了一种突变株表现出幼叶表皮蜡质积累增多。将基因突变株与野生型植株作为亲本构建了F₂代分离群体, 从F₂代中挑选极端性状个体构建高低混池, 提取RNA进行反转录并测序。然后利用RNA测序数据比对基因组

获得变异数据, 开发SNP标记, 计算SNP与性状连锁的概率, 最后将目的基因定位到4号染色体上一段长为2 Mb的位置, 并在该位置找到了*gl3*基因。该基因编码一种假定的myb转录因子, 直接或间接影响参与超长链脂肪酸生物合成的许多基因的表达, 从而使突变株幼叶表皮蜡质增多。

2 BSA技术在杀虫剂抗性基因定位中的应用

使用杀虫剂进行病媒控制是全球昆虫相关疾病战略的重要组成部分, 然而, 昆虫对杀虫剂产生抗药性使这项工作困难重重。目前, 关于昆虫抗药性机制的研究主要集中在行为抗性、靶标抗性、代谢抗性和穿透抗性四个方面。

2.1 昆虫杀虫剂抗性机制

行为抗性是指昆虫离开或逃脱杀虫剂区域的能力, 行为回避的机制可能因生命阶段和选择压力而异^[18]。与生理抗性水平较高的群体相比, 生理抗性水平较低的群体可能面临更强的选择压力, 因此更有可能发展回避行为(图2)。

靶标抗性又称击倒抗性(knockdown resistance, Kdr), 是由于化学杀虫剂作用部位的基因突变, 减少或阻止了杀虫剂在该部位的结合^[19]。常见的突变基因包括神经轴突钠离子通道(sodium channel, SC)、突触乙酰胆碱酯酶基因(acetylcholinesterase, AChE)和γ-氨基丁酸受体氯离子通道(γ-aminobutyric acid, GABA)。神经轴突钠离子通道是一种大型跨膜蛋白, 由2 000多个氨基酸残基组成, 是杀虫剂作用的靶标部位。*kdr*基因是导致蚊虫对滴滴涕和

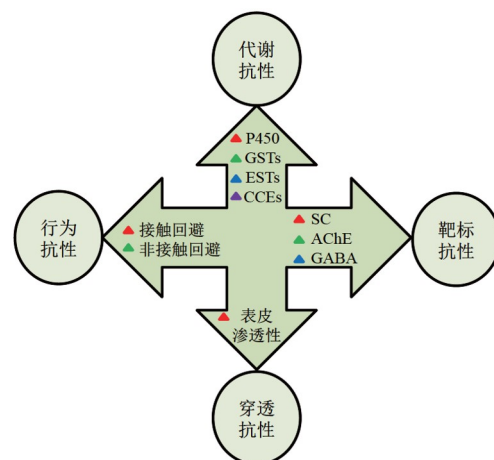


图2 杀虫剂抗性分子机理

拟除虫菊酯产生击倒抗性(L1014)的主要机制,*para L1014F(kdr)*突变的基因型导致拟除虫菊酯在靶点的亲和力降低,延长P450驱动解毒的持续时间,使昆虫表现出倍增的杀虫剂抗性^[20]。AChE是一种丝氨酸水解酶,它通过在胆碱神经突触处快速水解神经递质乙酰胆碱,终止神经冲动的传递。有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂通过羟基磷酸化丝氨酸酶活性位点,使乙酰胆碱分解受阻,导致突触后神经持续冲动,神经系统敏感性降低来杀死昆虫^[21](图2)。

代谢抗性是指昆虫参与化学杀虫剂代谢,隔离和排泄相关酶的过度表达或构象变化导致解毒作用增强^[22]。与代谢抗性相关的解毒酶系主要包括细胞色素P450酶系(cytochrome P450, P450s)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferases, GSTs)、非特异性酯酶(esterases, ESTs)和羧基/胆碱酯酶(carboxyl/cholinesterases, CCEs)四大酶系。P450s的主要功能是催化氧化有机化合物。GSTs通过直接代谢和抵抗杀虫剂暴露引起的氧化应激,使昆虫具有代谢氟虫腈及代谢产物的能力^[23]。ESTs主要参与昆虫对有机磷杀虫剂的代谢过程^[24],CCEs则可以提高昆虫对有机磷酸酯或氨基甲酸酯类杀虫剂的代谢能力^[25](图2)。

穿透抗性是指由于昆虫角质层或消化道衬里的改变,限制化学杀虫剂的吸收,导致渗透性降低^[26]。昆虫的身体被包裹在外骨骼或角质层中,角质层有助于保护昆虫免受伤害,防止水分流失,并能抵御杀虫剂,具有拟除虫菊酯抗性的蚊子表皮渗透性往往降低(图2)。

2.2 BSA技术在昆虫杀虫剂抗性中的应用现状

近十年来,BSA技术在昆虫杀虫剂抗性的分子机制研究中显得越来越重要,BSA技术结合基因编辑技术,扩增子测序等分子生物学方法使基因定位更加精准。大量BSA技术基因定位的研究结果表明,昆虫杀虫剂抗性的产生与靶标抗性和代谢抗性相关。Van Leeuwen等^[27]利用BSA技术,构建F₆遗传群体,定位叶螨乙恶唑抗性基因*tetur03g08510*,该基因编码几丁质合成酶,在表皮和器官系统中表达,在角质层形成过程中起重要作用。该基因在I1017F位点突变导致单个CHS1编码氨基酸变化,赋予靶点对乙恶唑的抗性。Yu

等^[28]在探究柑橘红螨双甲脒抗性的产生机制时,通过连续自交获得群体数量和基因重组率都足够大的F₅分离后代,利用BSA技术测序结合SNP-index与ED值关联定位候选基因*EVM0003193*。该基因位发生T752C突变,导致其mRNA的局部二级结构从长茎环结构变为三个短发卡结构,使柑橘红螨产生耐药性。Park等^[29]利用回交群体结合BSA技术定位了甜菜夜蛾抗性相关转运蛋白ABCC2。类似的,Yang等^[30]利用BSR技术结合扩增子测序技术将粉纹夜蛾抗Cry2Ab蛋白基因定位到17号染色体上。Zuo等^[31]结合BSA技术与CRISPR/Cas9基因编辑技术,将甜菜黏虫阿维菌素抗性位点T346G突变定位在17号染色体上的*CYP9A186*基因,并发现CYP9A186蛋白的氨基酸改变(F116V)导致阿维菌素代谢增强。

3 总结与展望

BSA技术为不同昆虫的杀虫剂抗性基因定位提供了新的基因定位思路,利用BSA技术进行基因定位最大的优势在于只需要挑选极端个体进行混池分析,很好地降低了研究成本,且应用范围广,在DNA、RNA和蛋白质层面都能展开研究。但在实际使用时BSA技术定位方法因遗传群体和目标性状遗传机制的不同而有所差别,且群体必须满足目标性状差异明显、其余遗传背景一致的特点,所以一般自然群体不建议直接使用BSA技术进行定位。与此同时,两个极端混池的表型分离必须准确,才能保证基因定位结果的准确性。

当拥有两个亲本以及准备构建两个子代混池时,用SNP-index关联ED值分析得到的候选区间取交集,是最常用的BSA技术。QTL-seq算法和G值统计在降噪的同时使QTL区间的定位更加准确,但在实际应用中需要注意窗口大小的选择以及有效SNP的确定;当丢失亲本只拥有两个子代混池时建议使用ED关联分析,但该方法对中等效应QTL检测结果较差;如果突变体表型是通过野生型诱变后获得,建议使用MutMap方法,该方法只需对分离后代突变型表型混池以及野生型亲本进行测序比对分析;如果亲本不纯合但又希望通过BSA技术进行基因鉴定,可以先通过基因分型鉴定表型,或者构建三个混池,通过多级混池测序分析

(graded-pool sequence, GradedPool-Seq)^[32], 采用radit检验计算窗口内SNP/Index的比值定位候选区间。

杀虫剂抗性分子机制复杂, 是昆虫行为躲避、靶标位点突变、代谢解毒酶活性增加、表皮透性下降等因素综合作用的结果, 每一种抗性机制背后都可能涉及多个基因位点的突变和表达变化。不同物种, 抗同一种杀虫剂抗性基因突变位点不同; 同一物种, 抗不同杀虫剂抗性基因突变位点也可能不同; 即使是同一物种, 用相同的杀虫剂进行选择, 不同时期不同生理状态下昆虫面临的生存压力不同, 也会产生不同的抗性突变。复杂的抗性机制给如何合理高效地使用杀虫剂带来挑战, 由于昆虫体内抗性相关突变分布范围广, 涉及基因多, 急需更快更有效的方式进行基因定位。

参考文献

- [1] Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(21): 9828-9832
- [2] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breeding*, 1996, 2(3): 225-238
- [3] Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, et al. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(6): 443-451
- [4] Navarro-Escalante L, Zhao C, Shukle R, et al. BSA-Seq discovery and functional analysis of candidate hessian fly (*Mayetiola destructor*) avirulence genes. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 956
- [5] Vogel G, LaPlant KE, Mazourek M, et al. A combined BSA-Seq and linkage mapping approach identifies genomic regions associated with *Phytophthora* root and crown rot resistance in squash. *Theor Appl Genet*, 2021, 134(4): 1015-1031
- [6] Zhang K, Yuan M, Xia H, et al. BSA-seq and genetic mapping reveals AhRt2 as a candidate gene responsible for red testa of peanut. *Theor Appl Genet*, 2022, 135(5): 1529-1540
- [7] Li R, Hou Z, Gao L, et al. Conjunctive analyses of BSA-Seq and BSR-Seq to reveal the molecular pathway of leafy head formation in chinese cabbage. *Plants*, 2019, 8(12): 603
- [8] Derakhshani B, Jafary H, Maleki Zanjani B, et al. Combined QTL mapping and RNA-Seq profiling reveals candidate genes associated with cadmium tolerance in barley. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0230820
- [9] Nashima K, Hosaka F, Terakami S, et al. SSR markers developed using next-generation sequencing technology in pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *Breed Sci*, 2020, 70(3): 415-421
- [10] Lim SE, Sa KJ, Lee JK. Bulk segregant analysis identifies SSR markers associated with leaf- and seed-related traits in *Perilla* crop (*Perilla frutescens* L.). *Genes Genomics*, 2021, 43(4): 323-332
- [11] 唐立群, 肖层林. SNP分子标记的研究及其应用进展. *中国农学通报*, 2012, 28(12): 154-158
- [12] Takagi H, Abe A, Yoshida K, et al. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J*, 2013, 74(1): 174-183
- [13] Magwene PM, Willis JH, Kelly JK. The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. *PLoS Comput Biol*, 2011, 7(11): e1002255
- [14] Hill JT, Demarest BL, Bisgrove BW, et al. MMAPP: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq. *Genome Res*, 2013, 23(4): 687-697
- [15] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(2): 174-178
- [16] 白凤虎, 李德芳, 陈安国, 等. 基于BSA分析法的分子标记基因定位技术在农作物中的应用. *中国麻叶科学*, 2006, 028(6): 282-288
- [17] Liu S, Yeh CT, Tang HM, et al. Gene mapping via bulked segregant RNA-Seq (BSR-Seq). *PLoS One*, 2012, 7(5): e36406
- [18] Lockwood JA, Byford RL, Story RN, et al. Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Environ Entomology*, 1985, 14(6): 873-880
- [19] Auteri M, La Russa F, Blanda V, et al. Insecticide resistance associated with kdr mutations in *Aedes albopictus*: an update on worldwide evidences. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 3098575
- [20] Dong K. A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997, 27(2): 93-100
- [21] 刘宏美, 代玉华, 公茂庆. 蚊虫抗药性分子机制研究进展. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(4): 4
- [22] Mao K, Zhang X, Ali E, et al. Characterization of

- nitenpyram resistance in *Nilaparvata lugens* (Stål). *Pesticide Biochem Physiol*, 2019, 157: 26-32
- [23] Gao H, Lin X, Yang B, et al. The roles of GSTs in fipronil resistance in *Nilaparvata lugens*: over-expression and expression induction. *Pesticide Biochem Physiol*, 2021, 177: 104880
- [24] DeSilva D, Hemingway J, Ranson H, et al. Resistance to Insecticides in Insect Vectors of Disease: est alpha 3, a Novel amplified esterase associated with amplified esterase 1 from insecticide resistant strains of the Mosquito *Culex quinquesfasciatus*. *Exp Parasitol*, 1997, 87(3): 253-259
- [25] Wei P, Chen M, Nan C, et al. Downregulation of carboxylesterase contributes to cyflumetofen resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Pest Manag Sci*, 2019, 75(8): 2166-2173
- [26] Chen LP, Wang P, Sun YJ, et al. Direct interaction of avermectin with epidermal growth factor receptor mediates the penetration resistance in *Drosophila* larvae. *Open Biol*, 2016, 6(4): 150231
- [27] Van Leeuwen T, Demaeght P, Osborne EJ, et al. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(12): 4407-4412
- [28] Yu SJ, Cong L, Pan Q, et al. Whole genome sequencing and bulked segregant analysis suggest a new mechanism of amitraz resistance in the citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag Sci*, 2021, 77(11): 5032-5048
- [29] Park Y, González-Martínez RM, Navarro-Cerrillo G, et al. ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biol*, 2014, 12(1): 46
- [30] Yang X, Chen W, Song X, et al. Mutation of ABC transporter ABCA2 confers resistance to Bt toxin Cry2Ab in *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2019, 112: 103209
- [31] Zuo Y, Shi Y, Zhang F, et al. Genome mapping coupled with CRISPR gene editing reveals a P450 gene confers avermectin resistance in the beet armyworm. *PLoS Genet*, 2021, 17(7): e1009680
- [32] Wang C, Tang S, Zhan Q, et al. Dissecting a heterotic gene through GradedPool-Seq mapping informs a rice-improvement strategy. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2982