



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108048591 B

(45) 授权公告日 2021.07.02

(21) 申请号 201711296892.4

(22) 申请日 2017.12.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108048591 A

(43) 申请公布日 2018.05.18

(73) 专利权人 江汉大学  
地址 430056 湖北省武汉市沌口经济技术  
开发区新江大路8号

(72) 发明人 方治伟 李论 周俊飞 彭海  
高利芬 胡长峰 刘致浩

(74) 专利代理机构 北京华沛德权律师事务所  
11302  
代理人 房德权

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/6895 (2018.01)  
C12Q 1/6869 (2018.01)  
C12Q 1/04 (2006.01)  
C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103343168 A, 2013.10.09

俞咪娜等. 稻瘟病标样中分离真菌的分析和  
鉴定.《植物病理学报》.2014,第44卷(第6期),  
573-580.

连璧.基于基因组重测序的方法研究稻瘟病  
菌菌株间的变异特点.《中国优秀硕士学位论文  
全文数据库》.2016,D046-110.

王玲.中国南方水稻纹枯菌和稻瘟菌种群遗  
传多样性及遗传结构的研究.《中国博士学位论  
文全文数据库》.2017,D046-23.

董妍涵.稻瘟病菌的组学分析和致病相关基  
因的挖掘及功能研究.《中国博士学位论文全文  
数据库》.2017,D046-7.

Chenxi Chen等.Genome comparison of  
two Magnaporthe oryzae field isolates  
reveals genome variations and potential  
virulence effectors.《BMC Genomics》.2013,  
1-12.

审查员 李佳栋

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种稻瘟病菌小种分离鉴定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种稻瘟病菌小种分离鉴定  
方法,属于小种鉴定技术领域。提取样品中的微  
生物的总核酸并构建高通量测序文库;寻找基因  
组上的变异位点;通过滑动平移筛选高多态性位  
点,并在在候选位点两侧设计多重扩增引物;利  
用固体培养基分离样品中的单菌落并做进一步  
纯化,以获得单克隆菌落;提取菌落的基因组DNA  
后利用上述步骤设计的引物进行扩增并测序;基  
于测序结果单克隆菌落进行分型,具有不同基因  
型的菌落作为不同的小种进行后续研究。本方法  
不需要预先知道样品中的小种数量以及丰度等  
信息,也无需传统的筛选过程中所需要生理生化  
鉴定试验,只需通过高通量测序和扩增即可分离  
培养出样品中的全部小种,过程简单、快速且流

程规范。

1. 一种稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 提取需要分离和鉴定的水稻叶片的总核酸,然后构建高通量测序文库;

(2) 采用高通量测序的方法对文库进行高覆盖深度的测序,并将测序结果比对到相应物种的参考基因组上;

(3) 根据比对结果获取所有的变异位点,然后按照窗口平移获得每个窗口的基因型数目,计算每个窗口的多态性,选择多态性高且处于单拷贝区域作为候选分子标记位点;所述变异位点的分析以测序片段为单位展开,标记出每条测序片段上与参考基因组不同的每个碱基位点及其突变类型;把具有相同突变碱基位点和突变类型的reads定义为该窗口内的一个基因型;

(4) 在每个分子标记位点的两侧寻找保守区域,在保守区域设计扩增引物;

(5) 将需要分离和鉴定的水稻叶片做10倍稀释后涂平板,恒温培养后挑取单个的菌落并在新的固体培养基平板上纯化后获得单克隆的菌落;

(6) 提取菌落的核酸后用步骤(4)设计的引物进行扩增,对扩增产物测序后分型;

(7) 所有分型结果相同的单克隆仅保留一个;若有部分已发现基因型在所有克隆中都不存在,则重新挑取菌落纯化并重复上述过程,直到获得该稻瘟病菌小种。

2. 根据权利要求1所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述步骤(1)中提取需要分离和鉴定的水稻叶片的总核酸时需要充分裂解细胞,确保提出每个小种的基因组序列。

3. 根据权利要求1所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述步骤(2)中测序时产生的测序片段数量要达到200倍数据,确保所有小种均被有效检测到。

4. 根据权利要求1所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述步骤(3)中分子标记位点的筛选以窗口平移的方式进行,窗口长度设为L;在窗口平移的过程中仅仅考虑可以完整覆盖该窗口的测序片段,其他测序片段均不考虑。

5. 根据权利要求3所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述获得该窗口的所有候选基因型,统计每类基因型的测序片段数量,并除以完整覆盖该窗口的测序片段的总数量,从而获得该基因型的频率。

6. 根据权利要求1所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述步骤(3)中选取的分子标记位点在该物种中具有特有的特征片段,且在混合测序的样品中表现出很高的多态性,多态性的计算方法为:  $D = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$ 。

7. 根据权利要求1所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述步骤(3)中选取的分子标记在基因组上处于单拷贝区域,基因组上其他位置不存在对该区域形成干扰的基因组片段;

单拷贝区域的判断标准为:1. 基于相似性判断:如果有参考基因组,则首先保证参考基因组上其他位置没有相似性大于90%、匹配长度大于100bp的区段;2. 基于测序深度的判断:其测序深度不超过临近区域平均测序深度±3倍标准差,临近区域指的是上下游各1,000bp的基因组区域。

8. 根据权利要求1所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述步骤(4)中分子标记两侧应有适合于引物设计的保守区域;对于长度为L的一个滑动窗口,窗口在基因组

上的起始位置设为S,该窗口终止位置为E,则窗口左侧保守区定义为坐标位置小于S、在测序数据中以及已有的数据中均未发现变异的连续n个碱基位点,窗口左侧保守区定义为坐标位置大于E、在测序数据中以及已有的知识中均未发现变异的连续n个碱基位点,其中, $n \geq 50$ ;

所述保守区内设计的引物3末端不含有低复杂序列。

9.根据权利要求1所述的稻瘟病菌小种分离鉴定方法,其特征在于,所述步骤(5)中稀释涂平板后过夜培养,然后挑取单个孢子在新的平板上继续27℃恒温培养;培养后通过菌落PCR获得每个位点的扩增产物;对扩增产物测序后即可获得每个扩增位点的基因型信息;理论上每个克隆的每个扩增位点只有一个基因型,若出现两个及以上的基因型,且次高丰度的基因与最高丰度的基因型的丰度比值超过0.1;则认为该菌落为非单克隆菌落,需重新纯合;若丰度比值低于0.1,则认为其他次高丰度的基因型为测序错误引入,最高丰度基因型为该扩增位点的真实基因型;

做稀释涂平板时,稀释的倍数应以最低基因型的频率为参考值:低于该值则会造成部分小种在在固体培养基丢失,高于该值则无法确保每个小种形成单菌落。

## 一种稻瘟病菌小种分离鉴定方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于小种鉴定技术领域,具体涉及一种稻瘟病菌小种分离鉴定方法。

### 背景技术

[0002] 稻瘟病菌每年对水稻生产造成巨大的损失,严重情况下可能导致绝收。不同的稻瘟病小种对水稻品种的危害程度有很大的差异。在农业防治中针对不同的稻瘟病小种应对策略也不同,因此确定分离、鉴定感染的是哪个小种是农业防治的第一步。

[0003] 小种又称生理小种、株系等,是指形态上没有明显差异,但在生理生化特性、培养性状、致病性等方面存在差异的同种微生物的不同群体。由于这些小种在致病性等特性上具有明显的差异,因此在做菌种分离和鉴定时往往需要做到小种的水平才具有意义。

[0004] 在现有技术中,至少存在以下问题:由于各小种之间在形态上没有明显差异,在获取样品并做分离培养后依然无法知道样品中包含有几个小种,具体是什么小种,只能通过酶切图谱、生理生化等其他实验对每个菌落逐个鉴别。这样就会导致三个问题:一是对所需要的稀释梯度没有任何信息,只能盲目的稀释后选择若干梯度进行后续实验;二是由于不知道具体有几个小种,因此某些小种会被漏筛;三是需反复对多个单克隆菌落做生理生化分析来筛选小种,存在对同一个小种重复检查的情况。其过程耗费大量人力物力,且不够准确全面。

### 发明内容

[0005] 本发的明目的是提供一种稻瘟病菌小种分离鉴定方法。

[0006] 本发明所采用的技术方案是:

[0007] 一种稻瘟病菌小种分离鉴定方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 提取需要分离和鉴定的水稻叶片的总核酸,然后构建高通量测序文库;

[0009] (2) 采用高通量测序的方法对文库进行高覆盖深度的测序,并将测序结果比对到相应物种的参考基因组上;

[0010] (3) 根据比对结果获取所有的变异位点,然后按照窗口平移获得每个窗口的基因型数目,计算每个窗口的多态性,选择多态性高且处于单拷贝区域作为候选分子标记位点;

[0011] (4) 在每个分子标记位点的两侧寻找保守区域,在保守区域设计扩增引物;

[0012] (5) 将需要分离和鉴定的水稻叶片做10倍稀释后涂平板,恒温培养后挑取单个的菌落并在新的固体培养基平板上纯合后获得单克隆的菌落;

[0013] (6) 提取菌落的核酸后用步骤(4)设计的引物进行扩增,对扩增产物测序后分型;

[0014] (7) 所有分型结果相同的单克隆仅保留一个;若有部分已发现基因型在所有克隆中都不存在,则重新挑取菌落纯化并重复上述过程,直到获得该稻瘟病菌小种。

[0015] 进一步地,所述步骤(1)中提取需要分离和鉴定的水稻叶片的总核酸时需要充分裂解细胞,确保提出每个小种的基因组序列。

[0016] 进一步地,所述步骤(2)中测序时产生的测序片段数量要达到200倍数据,确保所

有小种均可以被有效检测到。

[0017] 进一步地,所述步骤(3)中分子标记位点的筛选以窗口平移的方式进行,窗口长度设为L;在窗口平移的过程中仅仅考虑可以完整覆盖该窗口的测序片段,其他测序片段均不考虑。

[0018] 进一步地,所述步骤(3)中变异位点的分析以测序片段为单位展开,标记出每条测序片段上与参考基因组不同的每个碱基位点及其突变类型;把具有相同突变碱基位点和突变类型的reads定义为该窗口内的一个基因型。

[0019] 更进一步地,所述获得该窗口的所有候选基因型,统计每类基因型的测序片段数量,并除以完整覆盖该窗口的测序片段的总数量,从而获得该基因型的频率。

[0020] 进一步地,混合样品完成基因组测序后获得准确获得所有的基因型,排除错误的基因型。

[0021] 优选地,所述步骤(3)中选取的分子标记位点在该物种中具有特有的特征片段,且在混合测序的样品中表现出很高的多态性,多态性的计算方法为: $D = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$ 。

[0022] 进一步地,所述步骤(3)中选取的分子标记在基因组上处于单拷贝区域,基因组上其他位置不存在对该区域形成干扰的基因组片段;

[0023] 单拷贝区域的判断标准为:1.基于相似性判断:如果有参考基因组,则首先保证参考基因组上其他位置没有相似性大于90%、匹配长度大于100bp的区段;2.基于测序深度的判断:其测序深度不超过临近区域平均测序深度 $\pm 3$ 倍标准差,临近区域指的是上下游各1,000bp的基因组区域。

[0024] 进一步地,所述步骤(4)中分子标记两侧应有适合于引物设计的保守区域;对于长度为L的一个滑动窗口,窗口在基因组上的起始位置设为S,该窗口终止位置为E,则窗口左侧保守区定义为坐标位置小于S、在测序数据中以及已有的数据中均未发现变异的连续n个碱基位点,窗口左侧保守区定义为坐标位置大于E、在测序数据中以及已有的知识中均未发现变异的连续n个碱基位点( $n \geq 50$ );

[0025] 所述保守区内设计的引物3末端不含有低复杂序列,如polyA\T\C\G。

[0026] 进一步地,所述步骤(5)中稀释涂平板后过夜培养,然后挑取单个孢子在新的平板上继续27℃恒温培养;培养后通过菌落PCR获得每个位点的扩增产物;对扩增产物测序后即可获得每个扩增位点的基因型信息。理论上每个克隆的每个扩增位点只有一个基因型,若出现两个及以上的基因型,且次高丰度的基因与最高丰度的基因型的丰度比值超过0.1;则认为该菌落为非单克隆菌落,需重新纯合;若丰度比值低于0.1,则认为其他次高丰度的基因型为测序错误引入,最高丰度基因型为该扩增位点的真实基因型;

[0027] 做稀释涂平板时,稀释的倍数应以最低基因型的频率为参考值:低于该值则会造成部分小种在在固体培养基丢失,高于该值则无法确保每个小种的都可以形成单菌落。

[0028] 优选地,比较两个单克隆菌落是否相同时,要求每个扩增位点的基因型均相同才认为是两者属于同一个小种,否则为不同。

[0029] 进一步地,一次性确定混合样品中的小种数量,以保证不会漏筛某些小种;各基因型丰度的比值可以确定稀释涂布的倍数,提高筛选的效率。

[0030] 本发明具有以下优点:

[0031] 本发明的方法不需要预先知道样品中的小种数量以及丰度等信息,也无需传统的

筛选过程中所需要生理生化鉴定试验,只需通过高通量测序和扩增即可分离培养出样品中的全部小种,过程简单、快速且流程规范。对每个单克隆的筛查过程简单、快速、准确,且通量高,普遍适用于田间、温室等环境下采集的样品中快速筛查致病小种。

## 具体实施方式

[0032] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施方式作进一步地详细描述。如未加特殊说明,本发明中所用试剂均为市场上常见试剂,大多数生物技术公司均有销售,且效果等同。

[0033] 水稻叶片感染的稻瘟病菌小种的分离和鉴定

[0034] 本实施例中,感染稻瘟病的水稻叶片为材料,本实施例的目的是分离鉴定出叶片中存在的稻瘟病菌的不同小种。

[0035] 一、混合基因组DNA的提取

[0036] 从叶片病斑部位剪取1mg叶片,用去离子水将其表面清洗后加入液氮研磨。然后用PureLink Microbiome纯化试剂盒(货号:A29790,生产单位为赛默飞世尔科技(中国)有限公司)提取总的基因组DNA。

[0037] 二、高通量测序文库的构建及测序

[0038] 利用紫外分光光度计(NanoDrop oneC,赛默飞世尔科技(中国)有限公司)测定核酸的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值为1.92。用Qubit对提取核酸进行定量,确定提取的DNA浓度达到文库构建的量。采用Covaris System超声波打断仪(Covaris M220),将待测DNA打断成250bp大小,然后按照Ion torrent的全基因组文库构建试剂盒构建面PCR扩增的高通量测序文库。采用Ion torrent S5高通量测序仪进行测序。

[0039] 三、多态性分子标记位点的筛选方法

[0040] 3.1测序片段与基因组序列比对

[0041] 采用bowtie2(版本号2.1.0)把所有测序片段比对到稻瘟病菌的参考基因组上,稻瘟病参考菌基因组的版本号为GCA\_000002495.2,下载地址为:/data/pub/database/ncbi\_allBac20150129/marker/Magnaporthe\_oryzae/genome/,比对参数全部采用默认值。

[0042] 3.2变异位点分析

[0043] 根据比对结果统计基因组上的变异位点,方法如下:设定滑动窗口的大小为100bp,窗口每次向前移动30bp;对于每一个窗口,首先统计每条reads的变异位点信息,如基因组上的碱基为A,测序片段上对应的位点为T,则将该位点记录为T;如与基因组上的碱基信息相同,则记录为R。将所有碱基位点的信息作为一个整体表示该测序片段在该窗口上的基因型。由于在测序过程中引入的插入、缺失的发生比例较高,尤其是在简单重复序列的位置发生测序错误的比例会更高,因此我们忽略掉所有的插入、缺失位点,以及出现在简单重复区的所有变异位点。

[0044] 3.3计算每个窗口的多态性指数。

[0045] 统计每一个基因型的测序片段数量,并除以完全覆盖该窗口的测序片段的总数,则得到该基因型的百分比频率。该窗口的多态性指数计算公式如下: $D = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$ ,其中 $p_i$ 为第 $i$ 个基因型的频率。若该窗口内的多态性指数小于0.2,则该位点舍弃;假设该窗口

内第一个变异发生的位置为n,最后一个变异出现的位置为m,设 $L=200-(m-n)$ ,则在nbp到 $(n-L)$ bp的区域,以及mbp到 $(m+L)$ bp的区域检内查是否有一段长度超过50bp的保守区域存在,要求该区域内未检测到任何碱基变异,若两侧均存在符合要求的区域,则将该区域作为候选的多态性位点保留,否则舍弃该窗口。

[0046] 3.4分子标记位点的筛选

[0047] 窗口向前平移30bp,重复步骤3.1-3.3的步骤,从而得到每条染色体上的候选分子标记位点。然后按照多态性的高低选取前30个位点,然后去掉基因组上距离较近的位点,方法如下:设定一个长度为10,000bp的窗口检查该区域内是否有候选多态性位点,若无,则向前延伸5,000bp后重新寻找;若有一个位点,则将该位点保留;若存在多个位点,则选择多态性最高的一个位点保留。本实施例筛选出的高多态性分子标记位点见表1。

[0048] 表1稻瘟病菌高多态性分子标记位点

分子标记 位点编号	染色体编 号	起点	终点	SNP 数	基因型数	多样 性	最低基 因型频 率
[0049] 1	CM001231.1	1274679	1274903	6	2	0.636	35%
2	CM001236.1	624,501	624,686	7	2	0.832	43%
3	CM001236.1	1,239,971	1,240,188	8	2	0.514	32%
4	CM001236.1	1,336,631	1,336,826	6	3	0.570	9%
5	CM001236.1	3,351,755	3,351,986	11	2	0.517	45%

[0050] 四、引物设计方法

[0051] 登录LifeTechnology公司多重扩增引物在线设计网页<https://ampliseq.com>,点击“My References”选项,在新跳出的页面中选择“Addreference”选项,在跳出的页面中选中自己的参考基因组,并点击“save”,从而将所用的稻瘟病菌的参考基因组序列上传上去。然后点击“my design”选项下的“start a new design”选项,从而进入引物设计页面。在跳出的页面中,在“Select genome to use”选项中选择“Custom”,然后选择上述步骤上传的稻瘟病菌参考基因组序列,然后在“Application type”选项选择“DNA Hotspot designs (single-pool)”。然后选择“addtargets”按钮,在新的界面中输入每个候选多态性分子标记位点的起止信息,然后点击“Submit targets”选项开始引物设计。引物设计完成后,检测每个引物的3'末端是否有低复杂序列存在,包括连续多个A或者T或者C或者G,以及类似ATATAT这样的序列:如有,则需要在参考基因组上将此引物在基因组上的对应位点设为N后重新设计。本实施例获得分子标记位点的引物序列见表2。

[0052] 表2分子标记引物信息

扩增子编 号	染色体 编号	正向引物起 点	正向引物序列	反向引 物起点	反向引物序列	
[0053]	1	CM001231.1	1,274,679	TCAGGTTCTTGGCAGGGTG	1,274,882	ACCCTAACCCCTAACCTAACCC
	2	CM001236.1	624,501	TCACAAGGTAAGTACTGACTTGG	624,669	GCCACGCATGGAAGAGCT
	3	CM001236.1	1,239,971	CCTGCTCATTCCCGCTCATA	1,240,171	ACGCCTGACGCTGTTGAA
	4	CM001236.1	1,336,631	AAGCGAGCTCCCGAGCA	1,336,811	GAAGAACTGCCTAACCC
	5	CM001236.1	3,351,755	AGTAAAGCCGATGGAC	3,351,970	TGGAGCGGAATCGGACA

[0054] 五、利用固体培养基分离样品中的单菌落

[0055] 取1g水稻病斑部位的叶片,用75%的酒精进行表面消毒;然后在研钵内将其磨碎后加入10ml无菌水,震荡1min将其摇匀后从中取做10倍梯度稀释至 $10^{-4}$ 。按照如下配方制备固体培养基:马铃薯培养基(马铃薯200g,葡萄糖20g,蛋白胨5.0g,琼脂18g,水1000ml)。将固体培养基加热融化后,在超净工作台中将其倒入玻璃培养皿中静等其冷却凝固。然后取三个固体培养基平板,每个平板上加入1ml稀释至 $10^{-2}$ 的菌液,并将其均匀涂布在平板上。将涂布后的平板放在27℃下恒温过夜培养。

[0056] 六、单克隆菌落的获得

[0057] 用接菌环从单菌落挑取少量微生物菌体,在新的平板上划Z型线。划线后的平板重新在27℃下培养两天。用无菌镊子从菌落上挑取少量孢子加入到如下的PCR反应体系中:10×扩增缓冲液10ul,dNTP混合物200ul,引物100pmol,Taq DNA聚合酶2.5ul, $Mg^{2+}$ 1.5mmol/L,加双蒸水至100ul。PCR的扩增程序如下:95℃,2分钟;(95℃,10秒;55℃,30秒)×25个循环;4℃保温。

[0058] 七、各扩增位点的分型

[0059] 将各个分子标记位点的扩增产物做Sanger测序,并将测序结果与已检测到的该位点的所有基因型做比对,与其没有碱基差异的基因型则认为该位点属于这个的基因型。综合每个扩增位点的基因型信息确定对该单克隆菌落分型,所有分型相同的单克隆菌落即认为是属于同一个小种。本实施例中分离到的稻瘟病菌的小种及其基因型信息见表3。

[0060] 表3各分子标记在3个鉴定出的小种中的基因型信息

	1	2	3	4	5	
[0061]	小种 1	TTGGCA	AGGCAGC	CGCGCCCG	ATTACA	CGTGGGGATTT
	小种 2	TTGGCA	GACGGAG	CGCGCCCG	GCTGGG	TCCATATGCC
	小种 3	ACAATG	GACGGAG	TATATTTA	GCCGCA	CGTGGGGATTT

[0062] 本发明的方法不需要预先知道样品中的小种数量以及丰度等信息,也无需传统的筛选过程中所需要生理生化鉴定试验,只需通过高通量测序和扩增即可分离培养出样品中的全部小种,过程简单、快速且流程规范。对每个单克隆的筛查过程简单、快速、准确,且通量高,普遍适用于田间、温室等环境下采集的样品中快速筛查致病小种。

[0063] 最后所应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参

照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。