

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):1045–1052; 4 September 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.009

基于 454 测序技术的青藏高原黄绿蜜环菌微卫星引物的开发

邢睿^{1,2}, 高庆波¹, 张发起^{1,3}, 李印虎^{1,2}, 付鹏程^{1,2}, 张金华^{1,2}, 王久利^{1,2}, 陈世龙^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所, 高原适应与进化重点实验室, 青海 西宁 810008

²中国科学院大学, 北京 100049

³西南大学生命科学学院, 三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715

摘要:【目的】本研究利用 454 焦磷酸测序技术,对青藏高原黄绿蜜环菌(*Armillaria luteo-virens*) 转录组进行测序,从获得的 Expressed sequence tags (EST) 序列中开发 EST-SSR 引物。【方法】利用高通量测序获得的 EST 序列设计微卫星引物,通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳和毛细管电泳检测筛选出合格的微卫星引物。【结果】共得到了 1997121 条 reads,总数据量超过 80Mb,序列平均长度为 449bp。对于所获得的 reads 进行拼接后得到了 22236 条非冗余的 EST 序列,其中含有 2024 条 contigs (平均读长 974bp) 和 20212 条 singletons (平均读长 404bp)。在所有序列中共找到 321 条符合条件的含有 SSR 的序列,从中随机选择 98 对,成功开发出 27 对具有多态性条带的微卫星引物。利用采集自 3 个不同居群的 66 个个体对上述 27 对引物进行验证,有 17 对引物符合 Hardy-Weinberg 平衡且没有连锁不平衡现象。【结论】首次成功利用高通量测序技术开发的 EST-SSR 引物将会对今后黄绿蜜环菌遗传多样性的研究以及种质资源鉴定、遗传图谱构建等打下了坚实基础。

关键词:454 焦磷酸测序,黄绿蜜环菌,微卫星,遗传多样性,青藏高原

中图分类号:Q933 文章编号:0001-6209(2014)09-1045-08

青藏高原是世界上最年轻,同时也是平均海拔最高的高原,其平均海拔达到了 4500 米以上。它是全球重要的几个生物多样性丰富的热点地区之一,但是近年来受到全球气候变化的影响这一热点地区的动植物乃至真菌资源正经受着重大的考验^[1-2]。黄绿蜜环菌,主要分布在青藏高原东部草甸,与小蒿草(*Kobresia parva*)形成共生体,由于其子实体味道鲜美、同时具有中药药效每年 7–8 月都会被大量采集,加之近年来其生长区域的高寒草甸不断退化,

黄绿蜜环菌子实体资源也在逐年萎缩。因此,对黄绿蜜环菌遗传多样性和群落结构的研究显得尤为重要,其对于掌握黄绿蜜环菌遗传背景,从而指导今后的物种保护、资源的合理利用、人工育种工作都有着积极意义。

微卫星(microsatellite)标记,又称为短串联重复序列(simple tandem repeats)或简单重复序列(simple sequence repeats, SSR),是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,由 2–6 个核苷酸的

基金项目:国家自然科学基金(31270270, 31200281, 31110103911)

* 通信作者。Tel: +86-971-6110067; Fax: +86-971-6143282; E-mail: slchen@nwipb.cas.cn

作者简介:邢睿(1985–),男,黑龙江人,博士研究生,研究方向为青藏高原微生物研究。E-mail: xingruialex@gmail.com

收稿日期:2013-12-19;修回日期:2014-02-11

串联重复片段构成,由于重复单位的重复次数在个体间呈高度变异性并且数量丰富,因此微卫星标记的应用非常广泛,其中遗传多样性和群落结构方面已成为微卫星的研究热点之一^[3-5]。近些年,微卫星引物多利用磁珠富集法进行开发^[6-7],但是这种方法费时费力性价比不高,所以人们倾向于从现有的 Expressed sequence tags (EST) 序列中寻找现成的微卫星标记^[8],然而,来自非同一物种的 EST 序列中的微卫星标记存在着多态性低的问题,之前从 GenBank 中 *Armillaria mellea* 现有的 EST 序列开发的黄绿蜜环菌引物多态性较低就是个很好的例证^[9]。

454 测序技术和 Illumina Genome Analyzer、SOLiD System 并称为下一代测序技术,其测序原理是基于焦磷酸测序法,依靠生物发光对 DNA 序列进行检测。较 Illumina 和 SOLiD 的短读长相比,454 最新的 GS FLX Titanium 平台读长更长(最大 1000bp)的优势使其在未知基因组的测序、环境基因组的研究、转录组研究和表观基因组研究等方面具有一定的优势^[10]。

由于黄绿蜜环菌子实体有着较高的经济价值,之前的研究多集中在子实体成分分析以及菌丝体培养条件的优化研究上^[11-13]对于该菌的遗传背景的研究几乎是一片空白。本研究的目的在于:(1)利用 454 GS FLX Titanium 平台对黄绿蜜环菌转录组进行测序,除去接头、拼接之后从 EST 序列中找到符合要求的 SSR 序列(2)过滤出符合要求的含有 SSR 的 EST 序列设计引物,并对所设计的引物进行 PCR 多态性检测(3)利用毛细管电泳读出精确的 SSR 引物扩增出的条带大小,最后利用生物信息学软件对引物进行验证,从而为黄绿蜜环菌遗传多样性和群落结构的研究打下坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国)、凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国)、NanoDro 分光光度仪 (Thermo, 美国)、QIAxcel ScreenGel 毛细管电泳系统 (QIAGEN, 美国)、聚合酶链式反应 (PCR) 所用的 DNA 聚合酶、dNTP 购自大连 TaKaRa、TRIzol 购自 Invitrogen 公司。

1.2 子实体采集以及 454 测序

用于构建文库的黄绿蜜环菌材料于 2011 年七月采集于青海省玉树州曲麻莱县 (34°7'2"N, 95°48'52"E)。子实体采集后,迅速运送至中国科学院西北高原生物研究所高原生物适应与进化重点实验室表面消毒、切取菌柄和菌盖结合部的组织并接种于土豆培养基中培养 15d,将培养得到的菌丝体在液氮中研磨成粉而后采用 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂提取总 RNA,用 NanoDro 分光光度仪测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值计算总 RNA 得率并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度和完整性,最后将 3 个个体的总 RNA 混合保存至 TRIzol 中递送至上海美吉生物公司进行 cDNA 文库构建。文库由 SMART cDNA 文库构建试剂盒构建,经过割胶纯化之后 500-800 bp 大小的片段被保留了下来,再经过进一步的去接头和纯化工作之后,5 μg 双链 cDNA 打断为 300-800 bp 的片段,两端添加特异性衔接子 A 和 B,变性为单链连接到磁珠上,经 emPCR 富集于上海美吉生物公司 454 GS FLX Titanium 平台置于 PicoTiter Plate (1/4 板)上进行测序。最后,利用 454 自带软件 GSAssembler software V.2.0.01.14 进行序列拼接。

表 1. 黄绿蜜环菌样品采集地理信息

Table 1. Locality information of populations of *Armillaria luteo-virens* used in this study.

population	N	population location	longitude	latitude	altitude/m
Yang Long	25	Yang Long Qinghai, China	98°33'E	38°29'N	3777
Re Shui	20	Re shui Qinghai, China	100°28'E	37°28'N	3539
Ma Duo	21	Ma Duo Qinghai, China	98°27'E	34°61'N	4356
Yu Shu	3	Yu Shu Qinghai, China	95°48'E	34°7'N	4312

N = Numbers of individuals in the population.

1.3 引物设计和验证

Msatcommander^[14]被用来寻找含有 SSR 的 EST

序列,具体的参数设置为:含有二碱基重复至少 6 个、三碱基以及更多碱基重复至少 4 个。确定适当

的含有 SSR 序列之后, 从这些序列中随机选取 98 条序列用软件 Primer Premier 6.0^[15] 设计引物, 并用来自 3 个居群 (表 1) 的 66 个个体验证这些引物的可用性。这些居群均采集自青海省包括: 来自央隆乡 (Yang Long) 的 25 个个体、来自热水乡 (Re Sui) 的 20 个个体以及来自玛多县 (Ma Duo) 的 21 个个体。设计好的引物序列在上海生工生物公司合成之后进行 PCR 扩增, PCR 程序为 95℃ 变性 5 min、不同引物的不同退火温度 30 s、72℃ 延伸 30 s 进行 35 个循环最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应使用 15 μL 体系, 包括: 3 μL (30 ng) 全基因组 DNA、1.5 μL (10 × PCR buffer)、1.5 μL (1.5 mmol/L) MgCl₂、1.5 μL (10 mmol/L) dNTPs、0.30 μL (0.2 μmmol/L) 各引物, 以及 0.3 μL 的 *Taq* DNA 酶和 6.6 μL ddH₂O。经过琼脂糖凝胶电泳检测符合设计预期大小的引物用于进行多态性检测, 有多态性的引物经 66 个样品扩增后于 QIAxcel ScreenGel 毛细管电泳系统读出精确地片段大小。最后, 用 POPGENE version 1.3^[16] 计算等位基因数 (N_a)、期望杂合度

(H_E)、观察杂合度 (H_o)。用 GENEPOP version 4^[17] 计算引物是否符合 Hardy-Weinberg 平衡以及是否存在连锁不平衡现象。最后, 将具有多态性的 SSR 引物涉及的 EST 序列上传至 GenBank 以获得 GenBank accession number。

2 结果

2.1 454 测序结果

454 测序结果经去接头和过滤低质量的序列之后一共得到了 1997121 条 reads, 总数据量为 88585965 bp, 序列平均长度为 449 bp。对于所获得的 reads 进行拼接后得到了 22236 条非冗余的 EST 序列, 其中含有 2024 条 contigs (平均读长 974 bp、包含碱基数 2186 696) 和 20212 条 singletons (平均读长 404 bp、包含碱基数 8158700)。在序列长度分布方面, 多数 contigs 分布于 400–1400 bp 区间 (图 1-A), 而多数 reads 则分布在 400–600 bp 区间内 (图 1-B)。

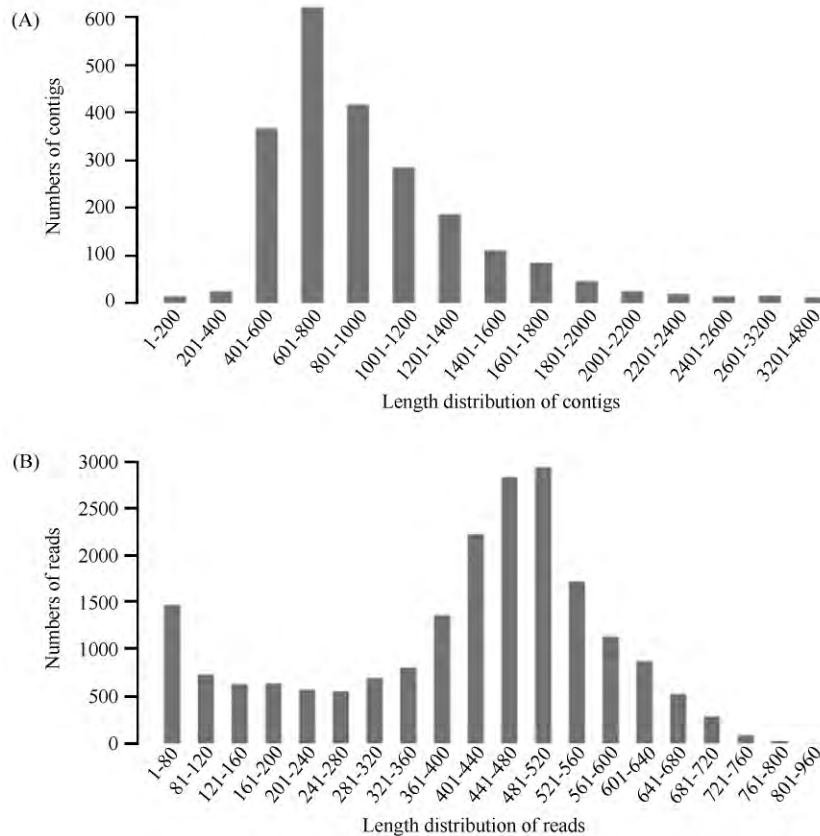


图 1. 454 测序 contigs (A) 和 reads (B) 的长度分布

Figure 1. Length distribution of contigs (A) and reads (B).

2.2 微卫星引物的开发和验证

利用 Msatcommander 软件共获得了 321 条含有符合条件的重复序列的 EST 序列,其中有 23 条序列含有二碱基重复(7.17%)、285 条序列含有三碱基重复(88.79%)、6 条序列含有四碱基重复(1.87%)、3 条序列含有五碱基重复(0.935%)、4 条序列含有六碱基重复(1.25%)(图 2)。在含量最多的三碱基重复当中($(GGT)_n$ (22.8%) 和 $(AGC)_n$ (15.8%) 最多、二碱基序列当中 $(CT)_n$ 含量最多,达到了 43.5%。

我们从 321 条序列当中随机选择 98 条设计、合成引物,引物经 PCR 扩增和琼脂糖电泳检测,有 5 对引物无扩增结果、7 对引物虽然有扩增结果但是条带大小不符合预期,在这剩下的 86(87.8%) 对引物当中有 27 对引物(表 2) 扩增出的条带呈现出了不同程度的多态性(图 3),占到引物总数的 27.6%。这 27 对引物的等位基因数(N_a) 范围为 2-8 平均值为 4.185、期望杂合度(H_E) 为小于 0.001

到 0.810 (ALV65) 平均值为 0.467,而观察杂合度(H_o) 则介于 0 (AIV64 和 AIV92) 和 0.900 (ALV8) 之间平均值为 0.423。从测试的 3 个居群来看并没有观察到连锁不平衡现象,然而 27 对引物当中有 10 对引物被观察到从 Hardy-Weinberg 平衡偏离的情况(表 3)。

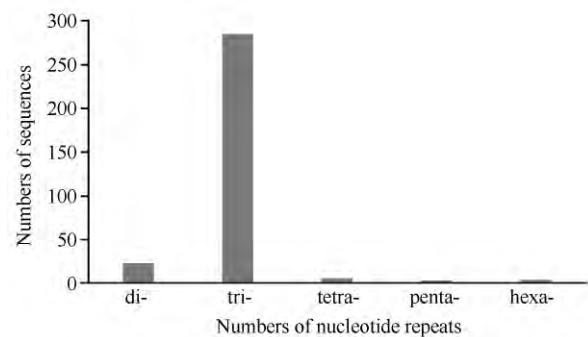


图 2. SSR 引物中各重复序列分布

Figure 2. The numbers of nucleotide repeats in SSR motif sequences from *A. luteo-tirens*.

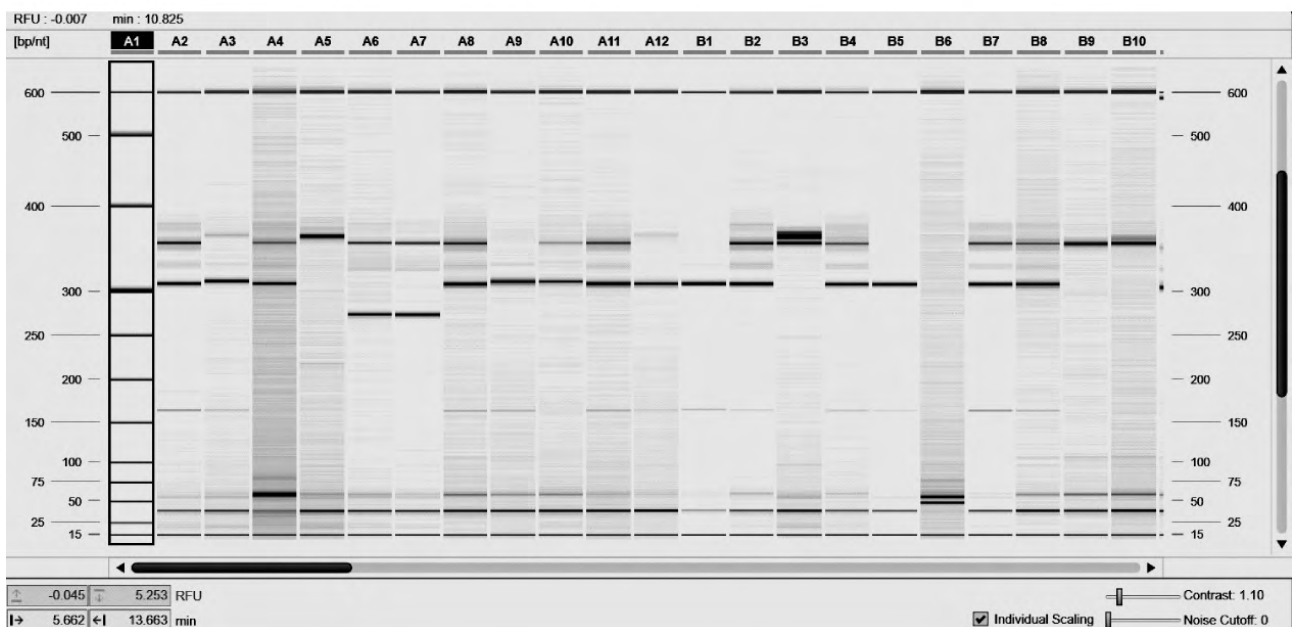


图 3. 引物 SSR 96 部分 PCR 扩增结果毛细管电泳检测图

Figure 3. The PCR results of primer SSR 96 showed on QIAxcel ScreenGel system.

表 2. 27 对呈现多态性的黄绿蜜环菌 SSR 引物基本信息

Table 2. Characterization of 27 microsatellite loci in *Armillaria luteo-virens*

locus	primer sequence (5'→3')	fragment size/ bp	repeat motif	T _a /°C	GenBank accession No.
AIV 8	F: CCGTGTAGGGTTAAT R: CAACCCGAACCTCAAACCTCAA	94 – 118	(AG) ₈	54	KC357676
AIV18	F: TCCAGCCAATCCAGCTC R: TGATGATGATGAGGATGACGG	101 – 121	(AC) ₉	54	KC357677
AIV24	F: TGGGTAATGAGGTTGG R: ACCACGACGAATCTTTTGA	142 – 170	(AGC) ₅	54	KC357678
AIV25	F: AGGTACTGATGGGGTT R: ACAACCTCCACAACCCCTCAT	179 – 191	(AGG) ₆	57	KC357679
AIV33	F: GGAGGTCTGGGATTCTG R: AGATGTGCAAGCTGCACATG	165 – 186	(ATC) ₆	54	KC357680
AIV37	F: TTGATACTCGTTGGCCG R: CTTTACGGCAACCATTTGTT	128 – 140	(GAT) ₈	54	KC357681
AIV45	F: CGTGTAGGGTTAATT R: TTGGATTCCACCTCTCTGCAT	117 – 129	(GAT) ₈	54	KC594361
AIV51	F: AACGGATTCTACAAGTG R: TTTTCTTCCCTATCCCTGTT	129 – 144	(GT) ₇	56	KC357682
AIV53	F: TGGGTGGTGCTAAGTGT R: CCTCTAGGTCGATTTCTACCG	140 – 164	(GTT) ₆	56	KC357683
AIV58	F: CAGGAAGAGGATGAGTC R: ATTGGCCAATGGTGACGAA	97 – 109	(ACC) ₆	54	KC357684
AIV59	F: GCGACCGACAGATGGAT R: ATCACATTCCTACCACCACCA	94 – 119	(AAG) ₆	54	KC357685
AIV60	F: TGATAGTCGCGGAACGC R: TTGGGACAACGTGACATCTT	80 – 116	(ACC) ₆	54	KC357686
AIV61	F: CAATCCAGCTCAGATCC R: GGGAACCTCTGTTGATGATGA	106 – 124	(ACC) ₆	54	KC357687
AIV64	F: TGAGGGTTTGAAGAA R: CACCACACCTTTTCCACA	190 – 202	(GGT) ₆	54	KC357688
AIV65	F: AGGTGCAATTGGACGCTG R: TAGCTTCAACCACTCCCTCA	156 – 171	(GTT) ₅	54	KC357689
AIV67	F: CGAAAGCACCCGACAGAA R: GGAGAGCAATACCAACCTGAA	190 – 208	(GTT) ₅	54	KC594352
AIV68	F: AAAGTCGGAGGTGGCAT R: TTATCAAACCGACCCGTCAT	170 – 191	(GTT) ₄	54	KC594351
AIV72	F: TAGGTGAGCTGATAGG R: AACAGCAGCAGCAGCAACAA	153 – 165	(GCT) ₄	54	KC594350
AIV73	F: TCCGTCACCTCTCTAAA R: CCATGTTTCTGTCTGTTATCG	169 – 178	(GAT) ₅	57	KC594357
AIV75	F: CTTATCGCGTGCAGTGT R: CCTGATGTTCTAACAGACGCA	305 – 314	(GTT) ₄	54	KC594356
AIV77	F: AGGAAGTTGCTGATCGT R: CATCTGCATTGACATAGGGCT	200 – 215	(GTT) ₄	54	KC594353
AIV82	F: TGTTCCCTCAAGTCTGT R: CGAAACGTTGAATACCTGGA	204 – 210	(CGT) ₄	54	KC594359
AIV84	F: ATTGTGCACGCTTGGAT R: ACCACTCGAATAACACCACCA	238 – 244	(CCT) ₄	54	KC594354
AIV86	F: GTCGCCTCCTAACGTCA R: TTGAGCCATCCGAGGAGATA	188 – 197	(ATC) ₅	54	KC594355
AIV89	F: TGAACCTTTCAGCAGGTT R: CGAAGAAGATGTGACGATTGG	224 – 236	(AGG) ₄	54	KC594358
AIV92	F: TGAGAACTTGGGCTCTA R: TGTGGTAGCCGCCATTCTT	267 – 276	(AGG) ₄	56	KC594360
AIV96	F: GGTTTTGGTGATGATGA R: ACAACCTCCACAACCCCT	348 – 372	(GGT) ₈ (GGT) ₅ (AGG) ₈	57	KC357679

F = Forward; R = Reverse; T_a = annealing temperature.

表 3. 27 对黄绿蜜环菌 SSR 引物的遗传学特性

Table 3. Summary information for 27 microsatellite loci in three *Armillaria luteo-virens* populations

locus	“Yang Long” (N = 25)			“Re shui” (N = 22)			“Ma Duo” (N = 21)		
	N_a	H_o	H_E	N_a	H_o	H_E	N_a	H_o	H_E
ALV8	8	0.900	0.740*	8	0.500	0.532*	9	0.613	0.605*
ALV18	3	0.767	0.663	3	0.200	0.319	3	0.564	0.612
ALV24	6	0.433	0.715*	6	0.200	0.468*	6	0.321	0.305*
ALV25	5	0.633	0.604	5	0.200	0.252	6	0.451	0.549
ALV33	3	0.500	0.497	3	0.133	0.380*	5	0.519	0.556
ALV37	3	0.267	0.494	3	0.267	0.367	4	0.374	0.485
ALV45	4	0.400	0.466	2	0.133	0.123	3	0.466	0.534
ALV51	3	0.600	0.719*	3	0.400	0.419	3	0.602	0.611
ALV53	4	0.667	0.664	4	0.567	0.461	4	0.581	0.635
ALV58	3	0.533	0.578	3	0.533	0.444	3	0.475	0.522
ALV59	2	0	0.066*	2	0	0.065*	3	0.342	0.431
ALV60	4	0.533	0.613	4	0.267	0.324	5	0.325	0.478
ALV61	4	0.633	0.652	4	0.300	0.433	5	0.481	0.519
ALV64	5	0	0.521*	5	0	0.182*	5	0.485	0.515
ALV65	5	0.733	0.810	5	0.433	0.528	5	0.654	0.732
ALV67	6	0.633	0.758*	6	0.433	0.561*	6	0.519	0.471*
ALV68	6	0.800	0.784*	6	0.533	0.541*	6	0.762	0.793
ALV72	4	0.533	0.051	4	0.433	0.445	4	0.539	0.624
ALV73	2	0.200	0.364	3	0.167	0.307	4	0.314	0.452
ALV75	3	0.267	0.432	4	0.200	0.328	4	0.425	0.526
ALV77	4	0.500	0.650*	5	0.400	0.541*	5	0.463	0.411
ALV82	4	0.433	0.494	4	0.300	0.346	4	0.568	0.692
ALV84	4	0.100	0.097	4	0.533	0.538	4	0.615	0.698
ALV86	3	0.033	0.098	3	0.167	0.207	3	0.258	0.316
ALV89	4	0.567	0.613	4	0.233	0.360	4	0.478	0.589
ALV92	3	0.433	0.640*	3	0.267	0.436*	3	0.485	0.515
ALV96	4	0.332	0.385	4	0.253	0.266	4	0.472	0.525

N_a = number of alleles; H_o = observed heterozygosity; H_E = expected heterozygosity. * Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after bonferroni correction ($p < 0.001$).

3 讨论

在本实验中我们利用罗氏 454GS FLX Titanium 平台,只使用了 1/4 plate 便获得了 80Mbp 以上的数据量,经过拼接去杂以后获得了 321 条含有 SSR 的 EST 序列,这些序列已经足够为将来的研究开发 SSR 引物。从之前的一些研究来看,从 EST 序列开发的 SSR 引物有着简单、经济的优势,因此被广泛应用于基因组学研究如遗传图谱构建、比较作图、遗传多样性评价、种质鉴定、系统发育与进化研究。然而,也有一些研究认为 EST-SSR 由于开发自基因的编码序列,而密码子以三核苷酸为一个功能单位,所以都是以二、三核苷酸重复为主,且由于基因编码区域的保守性,EST-SSR 具有多态性不足的缺陷^[18]。

本研究从 454 测序结果中共得到了 321 条含有 SSR 的 EST 序列,在这 321 条序列当中三碱基重复序列占到了 88.79%,印证了上述研究的结果。我们利用来自 3 个不同地理分布居群的 66 个个体对随机选取的 98 对引物进行验证,有 27 对引物具有多态性,但其中有 10 对引物偏离了 Hardy-Weinberg 平衡,这可能是因为实验涉及的居群及样本数较少导致的。剩余的 17 对引物在 3 个居群中的 H_E 均值分别为 0.475 (央隆)、0.355 (热水)、0.558 (玛多),表现出了中等偏高的遗传多样性,但在不同居群间 H_E 值的差异还是十分显著地,需要增加样本量在今后的研究中进一步验证。综上所述,这 17 对 EST-SSR 引物将为今后黄绿蜜环菌遗传多样性和居群结构的研究以及种质资源鉴定、遗传图谱构建、比较作图等打下了坚实基础。

参考文献

- [1] Zheng D. The system of physic-geographical regions of the Qinghai-Xizang plateau. *Science in China Series D: earth Sciences*, 1996, 39(1): 410-417.
- [2] Zhao Q, Wang G, Li Q, Ma S, Cui Y, Michael G. Genetic diversity of five *Kobresia* species along the eastern Qinghai-Tibet Plateau in China. *Hereditas*, 2006, 143(3): 33-40.
- [3] Jehle R and Arntzen J. Review: microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal*, 2002, 12(2): 1-9.
- [4] Jorde LB, Rogers AR, Bamshad M, Watkins WS, Krakowiak P, Sung S, Kere J, Harpending HC. Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(4): 3100-3103.
- [5] Orjuela SP, Su JM, Brandi MC, Rodrigues PT, Bastos MS, Amaratunga C, Duong S, Fairhurst RM, Ferreira MU. Higher microsatellite diversity in *Plasmodium vivax* than in sympatric *Plasmodium falciparum* populations in Pursat, Western Cambodia. *Experimental Parasitology*, 2012, 134(4): 318-326.
- [6] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 2012, 11(4): 1-16.
- [7] Shao K, Yan S, Zhao Y, Xong M, Xu N, Fang S. Seventeen microsatellite loci isolated from *Rhinogobio cylindricus* (Gunther), and their cross-amplification in six *Gobioninae* species. *Conservation Genetics Resources*, 2013, 5(1): 339-342.
- [8] Li Y, Korol A, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 2012, 11(2): 2453-2465.
- [9] Li Y, Xie Z, Tian F, Jia X, Fang H, Xia M. Establishment and primer screening of SSR-PCR reaction system for *Armillaria luteo-virens*. *Northern Horticulture*, 2013, 16(4): 114-119. (in Chinese)
- 李颖, 谢占玲, 田飞, 贾贤卿, 方慧, 夏明哲. 黄绿蜜环菌 SSR-PCR 反应体系的优化及引物筛选. *北方园艺*, 2013, 16(4): 114-119.
- [10] Cristian OR, Laura NL, Alejandro NM, Sonia AW. A first insight into *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 transcriptome. *Plosone*, 2013, 8(12): 1-14.
- [11] Feng K, Liu Q, Ng T, Liu H, Li JQ, Chen G, Sheng HY, Xie ZL, Wang HX. Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 345(4): 1573-1578.
- [12] Jiao YC, Chen Q, Zhou J, Zhang HF, Chen HY. Improvement of exo-polysaccharides production and modeling kinetics by *Armillaria luteo-virens* Sacc. in submerged cultivation LWT. *Food Science and Technology*, 2008, 41(4): 1694-1700.
- [13] Fu M, Liu J, Dong Y, Feng Y, Fang R, Chen Q, Liu X. Effect of ionic liquid-containing system on betulinic acid production from betulin biotransformation by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc cells. *Euro Food Resources Technology* 2011, 233(2): 507-515.
- [14] Brant C, Faircloth. msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(4): 92-94.
- [15] Vinay S, Sita N. Premier: A program for design of degenerate primers from a protein sequence. *Biotechniques*, 1998, 24(2): 318-319.
- [16] Yeh F, Yang R, Boyle T, Ye Z, Mao J. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. ed. Edmonton: University of Alberta Press, 1997: 97-112.
- [17] Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for windows and Linux. *Molecular ecology resource*, 2008, 8(4): 103-106.
- [18] Gutierrez MV, Patto MV, Huguet T. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110(7): 1210-1217.

Isolation and characterization of 27 polymorphic microsatellite markers in *Armillaria luteo-virens* (*Physalacriaceae*)

Rui Xing^{1,2}, Qingbo Gao¹, Faqi Zhang^{1,3}, Yinhu Li^{1,2}, Pengcheng Fu^{1,2}, Jinhua Zhang^{1,2}, Jiuli Wang^{1,2}, Shilong Chen^{1*}

¹Laboratory of Qinghai-Tibet Biological Evolution and Adaptation, Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, Qinghai Province, China

²Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

³Key Laboratory of Eco-Environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] The objectives of this study were to use Roche 454 GS FLX system to develop SSR markers for *Armillaria luteo-virens*. These datasets will be valuable for detecting genetic diversity and population structure of this species. [Methods] We collected *Armillaria luteo-virens* samples from Yushu in Qinghai province, China. Total RNA was isolated by using the TRIzol reagent, after that we constructed cDNA library and performed one quarter plate of the whole run 454 pyrosequencing. We selected 98 primer pairs randomly from the 321 SSRs to evaluate their application and the polymorphism across 66 individuals (*Armillaria luteo-virens*) representing 3 wild populations. [Results] Roche 454 sequencing yielded 197,121 reads with a total nucleotide size of 88,585,965bp. 27 of 98 SSRs loci were polymorphic. Numbers of alleles (N_a) ranged from 2 to 8. Expected heterozygosity (H_E) ranged from less than 0.001 to 0.810 at locus ALV65, while observed heterozygosity (H_o) from 0 at loci AIV64 and AIV92 to 0.900 at loci ALV8. We found no evidence of linkage disequilibrium, however 10 of 27 SSR markers showed significant deviation from Hardy-weinberg equilibrium. [Conclusion] These remaining 17 pairs of *Armillaria luteo-virens* SSR markers will be valuable for future research on detecting population structure and conservation of this species.

Keywords: 454 pyrosequencing, *Armillaria luteo-virens*, simple sequence repeat, genetic diversity, Qinghai-Tibet Plateau

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270270, 31200281, 31110103911)

* Corresponding author. Tel: +86-971-6110067; Fax: +86-971-6143282; E-mail: slchen@nwipb.cas.cn

Received: 19 December 2013/ Revised: 11 February 2014