麦类作物学报 2017,37(2):175－184
Journal of Triticeae Crops doi:10.7606/j.issn.1009－1041.2017.02.04

网络出版时间:2017－01－16
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1359.S.20170116.1833.008.html

青稞转录组SSR位点及其基因功能分析

徐金青[1,2],夏腾飞[1,2],王 蕾[1,5],王寒冬[1],张怀刚[1,5],刘登才[3],昌 西[4],沈裕虎[1,5]

(1.中国科学院高原适应与进化重点实验室,中国科学院西北高原生物研究所,青海西宁 810001;2.中国科学院大学,北京 100039;3.四川农业大学小麦研究所,四川温江 611830;4.西藏农牧学院,西藏林芝 860000;5.青海省作物分子育种重点实验室,青海西宁 810001)

摘 要:为了探讨青稞转录中SSR位点信息及其所在基因的生物学功能,使用MISA软件分析青稞转录组中SSR的分布频率和重复基元的基本类型,通过BLASTX对含有SSR的Unigene与nr、COG、Swiss-Prot和KEGG等公共数据库进行比对和功能注释。结果表明,在青稞转录组拼接得到的58 065个Unigene中发现9 576条序列中含有11 930个SSR位点,SSR发生频率为16.49%,平均每6.63 kb出现1个SSR位点,共有119种重复基元(motif)。青稞转录组SSR出现频率最高的是三核苷酸重复基元(64.19%),其次是二核苷酸重复基元(24.05%)。AG/CT和AGG/CCT、CCG/CGG、AGC/CTG分别是二核苷酸重复和三核苷酸重复中的优势重复基元。在转录组中SSR重复次数以5～12次为主,基序长度主要集中在12～25 bp,平均长度为21.15 bp。9 576个含SSR的Unigene与nr、COG、Swiss-Prot和KEGG等公共数据库进行BLASTX比对,分别得到7 987、5 559、5 588和2 077个注释。通过基因功能注释发现青稞转录组中含SSR的序列主要与生物的基础代谢相关。

关键词:青稞;转录组;SSR;功能注释

中图分类号:S512.3;S330 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-1041(2017)02-0175-10

Characterization and Gene Function Analysis of SSR Sequences in Hulless Barley Transcriptome

XU Jinqing[1,2],XIA Tengfei[1,2],WANG Lei[1,5],WANG Handong[1],ZHANG Huaigang[1,5],LIU Dengcai[3],CHANG Xi[4],SHEN Yuhu[1,5]

(1.Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota,Northwest Plateau Institute of Biology,Chinese Academy of Sciences,Xining,Qinghai 810001,China;2.University of Chinese Academy of Sciences,Beijing 100039,China;3.Triticeae Research Institute,Sichuan Agricultural University,Wenjiang,Sichuan 611830,China;4.Agricultural and Animal Husbandry College of Tibet University,Linzhi,Tibet 860000,China;5.Qinghai Province Key Laboratory of Crop Molecular Breeding,Xining,Qinghai 810001,China)

Abstract:In order to characterize the SSRs in hulless barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* HK. f.) transcriptome and annotate the SSR sequences based on bioinformatics analysis,the distribution frequency and basic repeat motifs of SSRs in hulless barley transcriptiome were screened by MISA software. The gene annotation of SSR sequences were obtained by BLASTX against nr,COG,Swiss-Prot and KEGG databases. A total of 11 930 SSRs with 119 kinds of repeat motifs were found in 58 065 Unigenes,distributed in 9 576 Unigenes,which accounted for 16.49% of all Unigenes,and the density of distribution was 6.63 kb per SSR. Among the SSRs in hulless barley transcriptome,the

收稿日期:2016-10-05 修回日期:2016-12-22
基金项目:青海省应用基础研究计划项目(2015-ZJ-702);中国科学院"西部之光"联合学者项目;西藏自治区西部提升计划"作物学学科建设"项目(XBTSZWXK-01)
第一作者 E-mail:xjq1088@126.com
通讯作者:沈裕虎(E-mail:shenyuhu@nwipb.cas.cn);昌 西(E-mail:164281890@qq.com)

most abundant repeat motif was the tri-nucleotide (64.19%), followed by the di-nucleotide (24.05%). AG/CT and AGG/CCT, CCG/CGG and AGC/CTG were the superior type in di-, and tri-nucleotide repeat motif(s). Most of the repeat number of SSRs was from 5 to 12, and the length of the motif ranged from 12 to 25 bp, with an average of 21.15 bp. 9 576 SSR sequences were annotated with BLASTX against protein databases (nr, COG, Swiss-Prot and KEGG), of which, 7 987, 5 559, 5 588 and 2 077 were annotated, respectively. The annotation of the SSR sequences in hulless barley suggested that they were mainly related to the basic biological metabolism.

Key words: Hulless barley; Transcriptome; SSR; Function annotation

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* HK. f.)是我国青藏高原及周边地区对大麦的一种特有的称呼,又称裸大麦,为禾本科大麦属[1]。作为世界上最早驯化的作物之一[2],大麦已成为继小麦、水稻、玉米之后的第四大种植的谷类作物[3],主要用于动物饲料、啤酒酿造、人类食用等方面。青稞因其生育期短,耐寒耐旱、耐瘠薄,特别适合高原地区生长,在中国青稞主要分布在西藏、青海、四川省甘孜和阿坝藏族自治区、甘肃省甘南藏族自治州以及云南、贵州的部分地区,是青藏高原地区分布最广、面积最大的粮食作物。此外,青稞具有高蛋白、高纤维、高维生素以及低脂肪、低糖的结构组成[1,4],富含多种维生素、膳食纤维以及多种氨基酸,是很好的保健食品。因此,青稞是一种集食用、饲用、酿造及药用于一身的作物,具有广阔的开发前景且日益受到人们的青睐。

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)又称简单序列长度多态性(simple sequence length polymorphism, SSLP)、短串联重复序列(short tandem repeats, STR)、微卫星(microsatellite) DNA,其串联重复的核心序列为 1~6 bp[5]。SSR 标记广泛分布在真核和原核生物基因组中,具有遗传共显性、扩增技术简单、基因组中广泛分布和多态性丰富等特点,已大量应用于遗传和物理图谱构建、基因定位、遗传多样性研究以及分子标记辅助育种中[5-6]。在青稞中,SSR 标记已广泛应用于遗传多样性评估及其与农艺性状的关联分析研究中。杨 菁等[7]和吴昆仑[8]利用 SSR 标记分析,分别证实青海省栽培青稞和来自西藏、青海、四川和云南的青稞种质资源具有丰富的遗传多样性;潘志芬等[9]利用 30 对 SSR 引物研究青藏高原栽培青稞的遗传多样性,并发现其在淀粉性状、抗病性、麦芽性状以及裸粒性状等都存在丰富的遗传变异;孟亚雄[10]等利用 92 对 SSR 标记对 108 份青稞进行遗传多样性分析,并通过关联分析找到与株高、穗长、穗粒数和分蘖数等农艺性状相关联的标记。

传统的 SSR(基因组 SSR, genomic-SSR)标记的开发局限于已知基因组信息的物种。而以 EST-SSR 为代表的 genetic-SSR 来源于基因的转录区,直接与基因功能相关,进而与相关的重要性状关联。二代测序技术的诞生,使得转录组测序广泛得到应用,在此基础上开发的 genetic-SSR 相比 EST-SSR 提供更大的数据基础,从而加速了 SSR 标记、特别是与重要性状关联的 SSR 标记的开发[5]。由于不依赖于基因组信息,由转录组开发的分子标记是根据基因本身的差异而建立的标记,不仅信息量大,而且通用性好,在亲缘物种之间矫正连锁图谱和比较作图方面具有独特的优势[11]。本研究通过对青稞转录组数据进行 SSR 检测,并分析 SSR 的序列特征及其组成情况,同时注释其所在序列的基因功能,推测其可能相关联的性状,以期为今后开展青稞遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建提供丰富的候选 SSR 标记,同时也为青稞分子标记辅助育种和功能基因定位研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与转录组数据

选取 4 个青稞栽培品种(表 1)作为试验材料,种植于培养间。当植株长出 4~5 片叶子时,取单株叶片利用 Trizol 法提取总 RNA 后,送至北京百迈克生物公司(Biomarker Technologies),利用 Illumina HiSeq 2000 进行转录组测序。测序数据(raw reads)经去除 rRNA、接头以及低质量的 reads,得到 clean reads。clean reads 利用 Trinity[12] 软件进行从头组装,然后使用 TGICL[13]去除冗余,得到共含 79 122 598 个核苷酸的 58 065 条 Unigene。

1.2　转录组 SSR 搜索分析

通过 MISA (MIcroSAtellite identification tool, http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/) 软件对转录组 Unigene 序列进行 SSR 位点识别,其识别条件为单核苷酸重复不低于 15 次,二核苷酸重复不低于 6 次,三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复不低于 5 次,复合 SSR 的识别条件是两个 SSR 位点间的距离不超过 100 bp。将生成的文本文件导入到 Excel 中进行基本的统计分析。SSR 发生频率=搜索到的含 SSR 的 Unigene 序列数量/总 Unigene 序列数量;SSR 分布频率=SSR 数量/总 Unigene 序列数量;SSR 分布的平均距离=总 Unigene 长度/搜索到的 SSR 数量[6,14]。

表 1　4 份供试青稞材料的基本信息

Table 1　Hulless barley materials used in this study

编号 Code	品种 Cultivar	类型 Type	来源 Origin
1	肚里黄　Dulihuang	农家品种　Landrace	甘肃甘南　Gannan, Gansu
2	昆仑 12　Kunlun 12	育成品种　Cultivar	青海农林科学院　Qinghai academy of agriculture and forestry sciences
3	无皮青稞　Wupiqingke	农家品种　Landrace	甘肃礼县　Lixian, Gansu
4	无叶耳青稞　Wuyeerqingke	农家品种　Landrace	甘肃甘南　Gannan, Gansu

1.3　青稞转录组中含 SSR 的 Unigene 的功能注释

通过 BLASTX,分别将青稞转录组中含 SSR 的 9 576 条 Unigene 序列比对到 nr(non-redundant)、COG(cluster of orthologous groups of proteins)、Swiss-Prot 以及 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)等蛋白数据库,比对参数 e 值$<10^{-5}$。将通过 BLASTX 与 nr 蛋白数据库比对生成的 XML 文件导入到 Blast2GO[15] 软件,得到转录组数据中含 SSR 的 Unigene 序列的基因本体(gene ontology, GO)注释信息,然后利用 WEGO(http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl)[16] 在线分析软件对注释的 Unigene 序列进行 GO 功能分类统计,分析含有 SSR 的 Unigene 的功能分布特征;通过与 COG 库进行比对后,得到的 Unigene 注释结果按照 COG 数据库的 23 个类别进行分类统计;对含有 SSR 的 Unigene 序列所参与的代谢途径的分析则是根据其在 KEGG 数据库中的比对注释信息,得到其在 KEGG 本体(KEGG orthology, KO)系统中的相应 K 编号,然后利用 K 编号将 Unigene 注释到相应的代谢通路上。

2　结果与分析

2.1　青稞转录组中 SSR 的序列特征

根据获取的 19.89 Gb 青稞 RNA-Seq 数据,利用 Trinity 软件组装得到 58 065 条 Unigene,总碱基数为 79 122 598 bp,平均每条 Unigene 长约 1.3 kb。使用 MISA 软件共搜索到 11 930 个 SSR,分布于 9 576 条 Unigene 上,其中含有多个 SSR(含复合 SSR)的 Unigene 共 1 875 条,占含 SSR 的 Unigene 序列总数的 19.58%。总体上,含 SSR 的 Unigene 序列占所有 Unigene 的 16.49%,平均每 6.63 kb 出现 1 个 SSR。

青稞转录组 SSR 重复类型丰富,从单核苷酸重复到六核苷酸重复均有出现,其中以三核苷酸重复为主(7 658 个),占 SSR 总数的 64.19%,分布频率为 13.19%;其次是二核苷酸重复(2 869 个),占 SSR 总数的 24.05%,分布频率为 4.94%;五核苷酸和六核苷酸重复 SSR 数量较少,二者加起来占 SSR 总数的 1.19%,分布频率分别为 0.19%和 0.05%(表 2)。二核苷酸重复的 SSR 平均长度最短,仅为 14.97 bp,六核苷酸重复 SSR 平均长度最长,为 31.45 bp(表 2)。三核苷酸重复 SSR 的平均分布距离最短(10.33 kb),而六核苷酸重复 SSR 平均分布距离最长(2 728.37 kb)(表 2)。

不同重复类型的青稞转录组 SSR 均有多种基元。在考虑碱基互补且包含复合 SSR 重复基元的情况下,单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复 SSR 出现的基元种类数分别为 2、4、10、33、48 和 22 种,共计 119 种基元(表 2)。在筛选到的 11 930 个 SSR 中,单核苷酸重复的优势基元为 C/G,占单核苷酸重复的 68.42%,占 SSR 总数的 3.05%,而 A/T 基元仅占单核苷酸重复的 31.57%,占 SSR 总数的 1.41%。说明对原始序列预处理时去除 5′端 polyT 和 3′端的 polyA 序列是有效的,基本可以排除假阳性 A/T 的存在。二核苷酸重复类型中,

AG/CT 基元最多，占该重复类型总数的 59.25%。三核苷酸重复类型的优势基元有 CCG/CGG、AGG/CCT 和 AGC/CTG 三种，分别占三核苷酸重复类型总数的 36.88%、20.34%和 16.02%，共 73.24%。四、五和六核苷酸重复类型中各基元的分布频率均较低，ATCC/ATGC、AGGGG/CCCCT 和 ACAGAG/CTCTGT 为各自的优势基元，分别占各自重复类型的 11.11%、10.62% 和 13.79%(表 2)。

青稞转录组 SSR 各重复类型在不同重复数下的数量存在明显差异(表 3)。由于单核苷酸重复类型的识别条件设置为重复数≥15，故在表 3 中对单核苷酸重复未做统计。除单核苷酸外的其余各重复类型的重复数介于 5～12 次之间，随着重复次数的增加，各重复类型的出现频率逐步降低。各重复类型的重复数主要集中在 5～7 次，占 SSR 总数的 70.49%。二核苷酸重复的主要重复数为 6～11，三核苷酸重复的主要重复数为 5～7 次，四核苷酸重复的重复数主要为 5～6，五、六核苷酸重复的主要重复数为 5。另外，重复数最多的基元为单碱基重复 C/G，重复次数为 40 次。三碱基重复 AAC/GTT 基元的重复数次之，为 29 次，这也是长度最长的重复(87 bp)。

表 2 青稞转录组中 SSR 各重复类型的分布特征

Table 2 Distribution characteristics of various SSR repeat types in hulless barley transcriptome

SSR 重复类型 Repeat type of SSR	SSR 数量 Number of SSR	占总 SSR 比例 Proportion accounting for total SSR/%	分布频率 Frequency/%	平均长度 Average length/bp	SSR 平均分布距离 Average distance/kb	基元种类数 Number of motif types	优势基元(占基元类型总数的百分比) Superior motif(Percentage accounting for the total motifs/%)
单核苷酸 Mononucleotide	532	4.46	0.92	17.49	148.73	2	C/G (68.42)
二核苷酸 Dinucleotide	2 869	24.05	4.94	14.97	27.58	4	AG/CT (59.25)
三核苷酸 Trinucleotide	7 658	64.19	13.19	16.67	10.33	10	CCG/CGG (36.88) AGG/CCT (20.34) AGC/CTG (16.02)
四核苷酸 Tetranucleotide	729	6.11	1.26	20.78	108.54	33	ATCC/ATGC (11.11)
五核苷酸 Pentanucleotide	113	0.95	0.19	25.53	700.20	48	AGGGG/CCCCT (10.62)
六核苷酸 Hexnucleotide	29	0.24	0.05	31.45	2 728.37	22	ACAGAG/CTCTGT (13.79)

表 3 青稞转录组 SSR 各重复类型在不同重复次数下的数量

Table 3 Number of various SSR repeat types with different number of repeats in hulless barley transcriptome

重复数 Repeat number	单核苷酸 Mononucleotide	二核苷酸 Dinucleotide	三核苷酸 Trinucleotide	四核苷酸 Tetranucleotide	五核苷酸 Pentanucleotide	六核苷酸 Hexnucleotide
5	—	—	4 635	603	104	23
6	—	1 079	1 972	121	8	5
7	—	663	945	3	1	1
8	—	423	91	1	0	0
9	—	296	7	0	0	0
10	—	209	0	0	0	0
11	—	158	2	0	0	0
>12	—	41	6	1	0	0
总计 Total		2 869	7 658	729	113	29

—表示不符合鉴定条件。

— indicated that did not meet the analysis conditions.

青稞转录组 SSR 基元长度分布如图 1 所示。总体看来，青稞转录组的基元长度分布在 12～87 bp。大部分青稞转录组 SSR 基元长度集中在 12～25 bp(11 869 个)，占 SSR 总数的 99.49%。基元长度为 26～29 bp 的 SSR 数量仅为 12 个，占 SSR 总数的 0.10%。大于 30 bp 的有 49 个，仅占 SSR 总数的 0.41%。其中基元长度为 15 bp 的 SSR 数量最多，有 4 748 个，占 SSR 总数的 39.80%。基元长度为 18 bp 的 SSR 数量次之(2 315 个)，占 SSR 总数的 19.40%。基元(AG/

CT)长度为 26 bp 的 SSR 重复仅有 1 个。未出现基元长度为 29 bp 的 SSR。

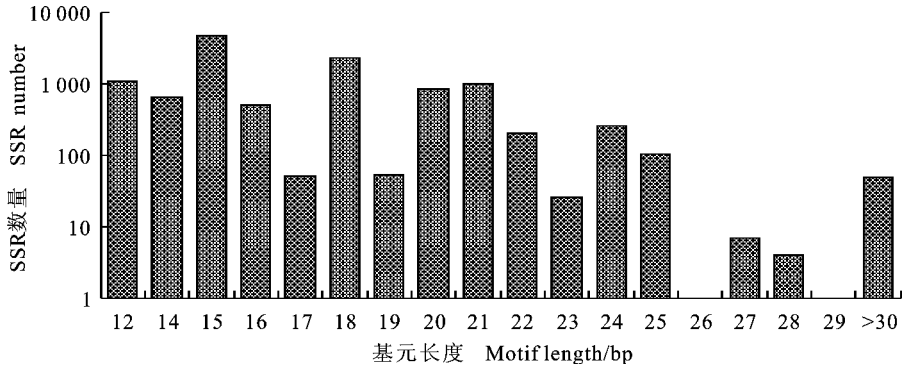


图 1　青稞转录组 SSR 重复序列长度的分布频率

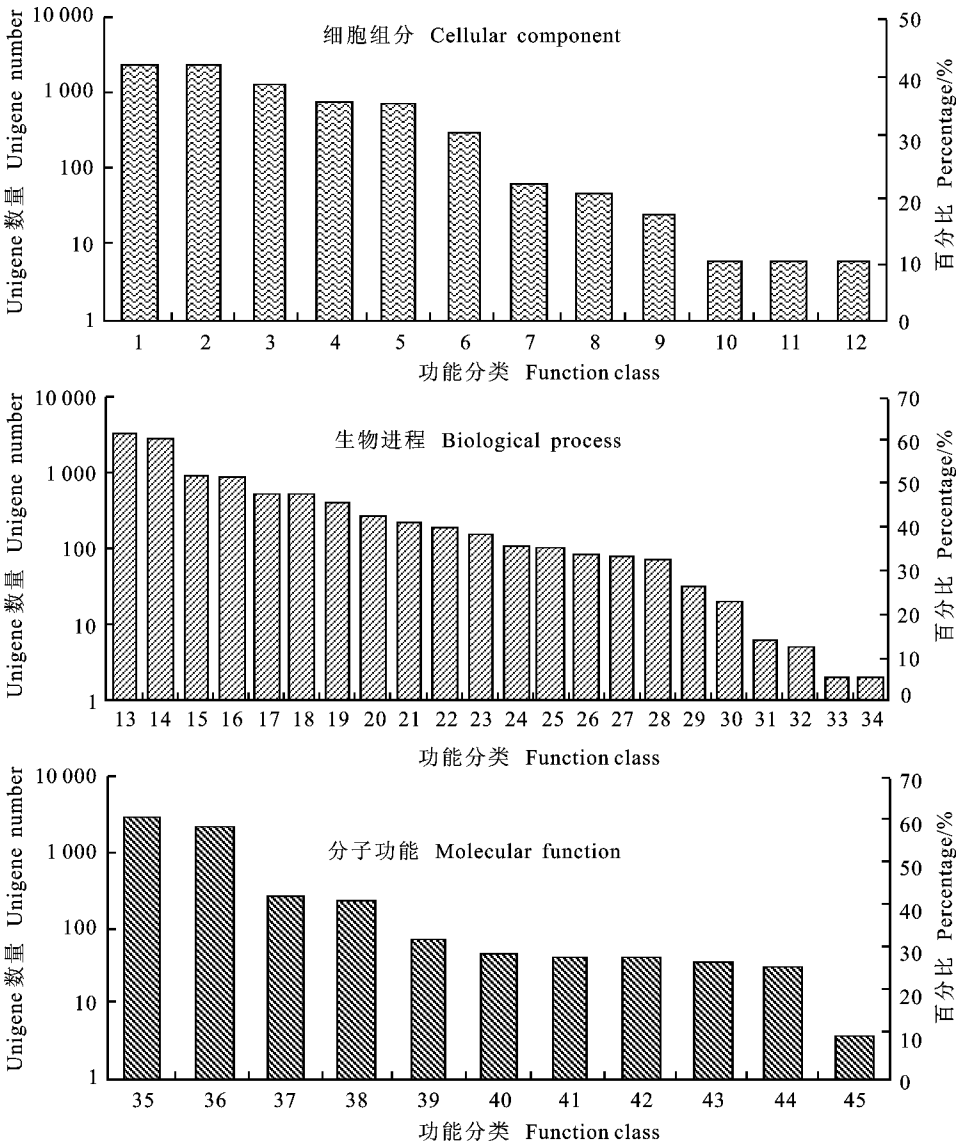
Fig. 1　Frequency of repeat sequence length in hulless barley transcriptome

2.2　青稞转录组中含 SSR 序列的基因功能注释

通过 MISA 软件的搜索,共有 9 576 条 Unigene 含有 SSR。为了解青稞转录组中含有 SSR 序列的基因功能,本研究通过与公共蛋白数据库进行比对,以期得到含有 SSR 序列的 Unigene 的功能注释及分类信息。结果发现,有 7 987、5 559、5 588、2 077 条 Unigene 分别与 nr、COG、Swiss-Prot 和 KEGG 比对得到注释信息,有 1 683条 Unigene 在上述 4 个数据库中得到共同注释信息。

GO 注释用于描绘基因及其基因产物的特点,将基因功能分为 3 个本体,即细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物进程(biological process)。其下又分了很多亚类,各类间互相关联,从不同角度对基因的功能进行分类注释。通过对含 SSR 的青稞 Unigene 进行 GO 注释,可以全面描述青稞中含 SSR 基因和基因产物的属性。将搜索到含有 SSR 的 Unigene 序列使用 BLASTX 比对到 nr 蛋白数据库,取比对分值最高的为序列的注释信息。其中 7 987条 Unigene 序列得到了注释信息,1 589 条 Unigene 序列无注释信息。再使用 Blast2GO 软件进行含 SSR 的 Unigene 的 GO 注释,有 5 015 条 Unigene 序列取得相应的 GO 分类号,占含 SSR 的 Unigene 序列总数的 52.37%,其他 2 972 条不能成功注释。将含有 SSR 序列的 5 015 条 Unigene 编号及其对应的 GO 分类号导入到 GO 分类图形显示在线分析工具 WEGO 软件中,得到其基因功能分布(图 2)。结果表明,有 GO 注释的 5 015 条 Unigene 序列被分配至细胞组分、分子功能和生物进程 3 个本体下的 45 个亚类中,3 个本体分别包含 12、11 和 22 个亚类。在注释到生物进程类的 Unigene 中,分别有 3 156 条、2 627条被注释到代谢进程(metabolic process)和细胞进程(cellular process),分别占注释为该类的 Unigene 数量的 62.93%和 52.38%。在细胞组分中,分别有 2 194 和 2 164 条具有 GO 分类号的 Unigene 被注释到细胞(cell)和细胞成分(cell part)中,分别占注释为该类的 43.75%和 43.15%。而在分子功能中,结合活性(binding)和催化活性(catalytic activity)是两个最主要的功能分类,各有 2 993 条和 2 275 条,分别占注释为该类的 59.68%和 45.36%,其中多被注释为转移酶活性(transferase activity)、水解酶活性(hydrolase activity)、核苷酸结合(nucleotide binding)。综合以上信息,在青稞转录组中鉴定出的含有 SSR 的 Unigene 主要是参与细胞的基础代谢活动。

COG 数据库是基于细菌、藻类和真核生物的系统进化关系构建得到的,可以对基因产物进行直系同源分类。对青稞转录组中含有 SSR 的 Unigene 进行 COG 分类(图 3),共获得 5 559 个 COG 功能注释,涉及 4 个类别、23 个功能亚类。总体来看,除缺乏注解(poorly characterized)的 1 639条 Unigene 外(其中 984 条为一般功能预测,655 条为功能未知),注释到细胞进程及信号传递(cellular processes and signaling)、信息存储及处理(information storage and processing)和代谢(metabolism)三大类别的分别有 1 512 条、1 235条和1173条,分别占具COG功能注释



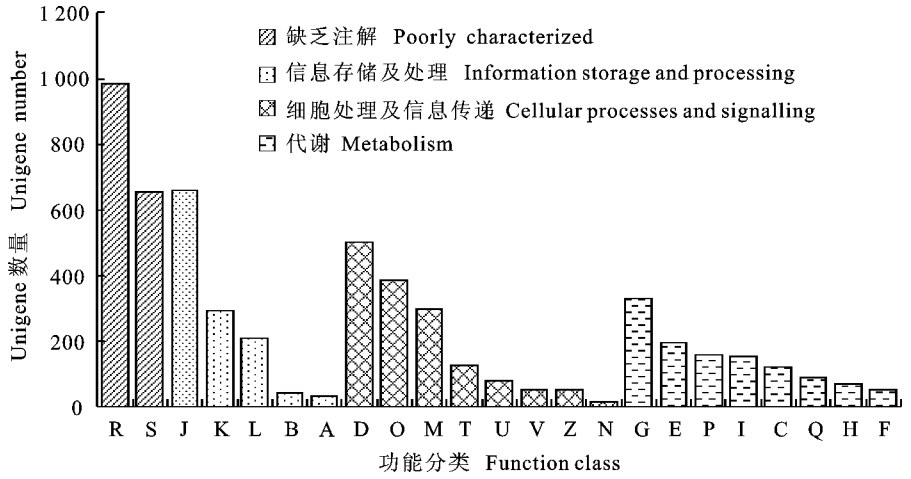
1:**细胞**;2:**细胞成分**;3:**细胞器**;4:**细胞器组分**;5:**大分子复合物**;6:**细胞膜**;7:**细胞被膜**;8:**细胞外区域**;9:**共质体**;10:**病毒体**;11:**细胞外区域部分**;12:**病毒粒子部分**;13:**代谢进程**;14:**细胞进程**;15:**生物调节**;16:**色素沉积**;17:**定位**;18:**建立定位**;19:**刺激反应**;20:**细胞成分组织**;21:**细胞成分的生物合成**;22:**多细胞生物进程**;23:**发育过程**;24:**废弃的生物进程**;25:**解剖结构形成**;26:**繁殖**;27:**生殖过程**;28:**多有机体过程**;29:**生长**;30:**免疫系统的过程**;31:**死亡**;32:**病毒繁殖**;33:**生物附着**;34:**节律过程**;35:**结合**;36:**催化活性**;37:**转运活性**;38:**转录调节活性**;39:**结构分子活性**;40:**翻译调节活性**;41:**分子传感活性**;42:**抗氧化活性**;43:**酶调节活性**;44:**电子载体活性**;45:**营养物储存活性**。

1:Cell;2:Cell part;3:Organelle;4:Organelle part;5:Macromolecular complex;6:Membrane;7:Envelope;8:Extracellular region;9:Symplast;10:Virion;11:Extracellular region part;12:Virion part;13:Metabolic process;14:Cellular process;15:Biological regulation;16:Pigmentation;17:Localization;18:Establishment of localization;19:Response to stimulus;20:Cellular component organization;21:Cellular component biogenesis;22:Multicellular organismal process;23:Developmental process;24:Obsolete biological process;25:Anatomical structure formation;26:Reproduction;27:Reproductive process;28:Multi-organism process;29:Growth;30:Immune system process;31:Death;32:Viral reproduction;33:Biological adhesion;34:Rhythmic process;35:Binding;36:Catalytic activity;37:Transporter activity;38:Transcription regulator activity;39:Structural molecule activity;40:Translation regulator activity;41:Molecular transducer activity;42:Antioxidant activity;43:Enzyme regulator activity;44:Electron carrier activity;45:Nutrient reservoir activity.

图 2 青稞转录组中含 SSR 的 Unigene 的 GO 注释

Fig. 2 GO annotation of Unigenes containing SSR in hulless barley transcriptome

Unigene 数量的 27.20%、22.22%和 21.10%。在细胞进程及信号传递类中,有 502 条注释到细胞周期控制(cell cycle control)、细胞分裂(cell division)及染色体分隔(chromosome partitioning)亚类,有 386 条注释到翻译后修饰(posttranslational modification)、转运(protein turnover)及分子伴侣(chaperones)亚类,有 297 条注释到细胞壁(cell wall)、细胞膜(cell membrane)及质膜(envelope)的生物合成亚类中,分别占该类的 33.20%、25.53%和 19.64%。没有 Unigene 注释到细胞核结构(nuclear structure)和细胞外结构(extracellular structures)亚类。在信息存储及处理类中,有 659 条注释到翻译(translation)、核糖体结构(ribosomal structure)及生物合成(biogenesis)亚类,有 292 条注释到转录(transcription),有 209 条注释到复制、重组和修复(replication, recombination and repair)亚类,有 75 条注释到染色质结构和动力学亚类,分别占该类的 53.36%、23.64%、16.92%和 6.07%。在代谢类中,有 330 条注释到碳水化合物运输与代谢(carbohydrate transport and metabolism)亚类,占该类的 28.13%,其次是氨基酸转运及代谢(amino acid transport and metabolism)、无机盐转运及代谢(inorganic ion transport and metabolism)和脂质转运及代谢(lipid transport and metabolism)。



R:一般功能预测;S:未知功能;J:翻译、核糖体结构和生物合成;K:转录;L:复制、重组和修复;B:染色体结构与动力学;A:RNA 加工与修改;D:细胞周期控制、细胞分裂、染色体分隔;O:翻译后修饰、蛋白质反转、分子伴侣;M:细胞壁、细胞膜、质膜生物合成;T:信号转导机制;U:细胞内运输、分泌和囊泡运输;V:防御机制;Z:细胞骨架;N:细胞运动;G:碳水化合物转运和代谢;E:氨基酸转运和代谢;P:无机盐转运和代谢;I:脂质转运和代谢;C:能量产生与转换;Q:次生代谢产物的合成、转运和代谢;H:辅酶转运和代谢;F:核苷酸转运和代谢。

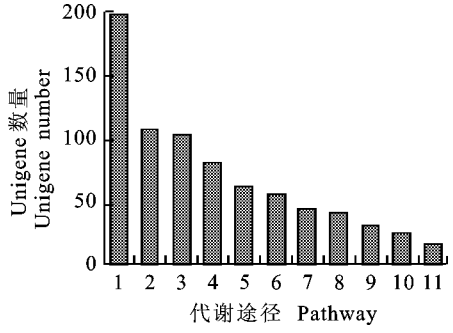
R: General function prediction only; S: Function unknown; J: Translation, ribosomal structure and biogenesis; K: Transcription; L: Replication, recombination and repair; B: Chromatin structure and dynamics; A: RNA processing and modification; D: Cell cycle control, cell division and chromosome partitioning; O: Posttranslational modification, protein turnover and chaperones; M: Cell wall, membrane and envelope biogenesis; T: Signal transduction mechanisms; U: Intracellular trafficking, secretion and vesicular transport; V: Defense mechanisms; Z: Cytoskeleton; N: Cell motility; G: Carbohydrate transport and metabolism; E: Amino acid transport and metabolism; P: Inorganic ion transport and metabolism; I: Lipid transport and metabolism; C: Energy production and conversion; Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and metabolism; H: Coenzyme transport and metabolism; F: Nucleotide transport and metabolism.

图 3　青稞基因组中含 SSR 的 Unigene 的 COG 功能注释

Fig. 3　Functional classification of SSR Unigene in hulless barley transcriptome based on COG analysis

通过与 KEGG 数据库的比对,可以分析含 SSR 的 Unigene 在青稞代谢途径中的富集情况。注释 KEGG 代谢通路时,会给每一个功能基因定一个 K 编号(K numbers),并注释到具有相应归类的代谢通路(pathway)中。分析发现,有 2 077 条(21.69%)含 SSR 的 Unigene 具有 KEGG 注释结果,共得到 1 225 个 K 编号并被注释到 312 个 KEGG 代谢通路中,平均 1.70 个 Unigene 具有相同的功能,说明 Unigene 中有许多功能相同。另外的 7 499 条(78.31%)未得到注释结果。在

对注释到的 312 个通路图进行分析时，利用 KEGG 数据库的分类，将其归类到全部 7 大类代谢通路中，其中被注释到新陈代谢（metabolism）和遗传信息处理（genetic information processing）类的 Unigene 数量最多，分别有 534 和 490 条，占全部含 SSR 的 Unigene 的 5.58%和 5.12%，占能注释到通路的 Unigene 的 25.71%和 23.59%。对注释到新陈代谢通路中的 Unigene 作进一步分类分析，结果（图 4）发现，除化学结构转化图（chemical structure transformation maps）亚类外，其他亚类中均有分布。注释到碳水化合物代谢、能量代谢、氨基酸代谢和脂质代谢途径中的 Unigene 占主导地位，分别有 199、107、104 和 81 条，各占新陈代谢通路的 37.27%、20.04%、19.48%和 15.17%。这与 GO 注释得到的基础代谢为主的注释结果一致。



1：碳水化合物代谢；2：能量代谢；3：氨基酸代谢；4：脂质代谢；5：辅因子及维生素代谢；6：核苷酸代谢；7：萜类及聚酮代谢；8：其他氨基酸代谢；9：其他次生产物代谢；10：聚糖生物合成及代谢；11：异质物降解及代谢。

1: Carbon metabolism; 2: Energy metabolism; 3: Amino acid metabolism; 4: Lipid metabolism; 5: Metabolism of cofactors and vitamins; 6: Nucleotide metabolism; 7: Metabolism of terpenoids and polyketides; 8: Metabolism of other amino acids; 9: Biosynthesis of other secondary metabolites; 10: Glycan biosynthesis and metabolism; 11: Xenobiotics biodegradation and metabolism.

图 4 青稞转录组中注释到新陈代谢通路中的含有 SSR 的 Unigene 的代谢途径分析

Fig. 4 Analysis of Unigenes containing SSR in hulless barley transcriptome annotated to metabolism pathway

有 5 588 条含 SSR 的 Unigene 在 Swiss-Prot 数据库中比对得到注释信息，其中有 68 条直接得到了在大麦（*Hordeum vulgare*）中的注释信息，2 946条是在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中的注释信息，1 040 条是在水稻（*Oryza sativa*）中的注释信息，84 条是在玉米（*Zea mays*）中的注释信息，72 条是在小麦（*Triticum aestivum*）中的注释信息。在 Swiss-Prot 数据库中得到注释的 5 588 条 Unigene 中有 5 573 条在 nr 库中也得到了注释信息，其功能涵盖了生物进程、细胞组分和分子功能三大类。因此 GO 注释的分类结果也可以大致用来解释在 Swiss-Prot 数据库得到注释的 5 588条 Unigene 的分类信息。

3 讨 论

3.1 青稞转录组中 SSR 的序列特征

在本研究中，青稞转录组 SSR 分布频率为 1/6.63 kb，与之前从大麦的 EST 数据中搜索到的 SSR 的频率基本一致（1/6.30 kb）[17]。与其他植物相比较，青稞转录组 SSR 出现频率高于小麦（1/15.60 kb）[18]、大豆（1/7.40 kb）[17]、番茄（1/11.10 kb）[17]、玉米（1/8.10 kb）[17]、拟南芥（1/13.83 kb）[17]、杨树（1/14.00 kb）[17]、棉花（1/20.00 kb）[17,19]和洋葱（1/14.10 kb）[20]。这表明，青稞转录组中 SSR 数量很丰富，出现频率比较高，考虑到在本文中搜索到的 SSR 基于转录组测序数据，因此这些 SSR 都有较高的利用潜能。

从目前已有的报道来看，大多数植物的 EST-SSRs 的重复单元类型以二核苷酸和三核苷酸为主。大麦[17,21]、燕麦[17]、黑麦[17]、水稻[21-22]、小麦[21]、高粱[21]、玉米[21]、藏茵陈川西獐牙菜[23]、洋葱[20]、云南松[14]等植物中以三核苷酸为主。而在党参[24]、野三七[25]、灯盏花[26]、茶树[27]等植物中则是以二核苷酸重复为主。此外南方红豆杉[28]、巴西橡胶树[29]的优势重复基元为六核苷酸。在本研究中，青稞转录组中的 SSR 序列以三核苷酸重复为主，其次是二核苷酸重复，不同重复类型的 SSR 数量随基元碱基数量增加呈下降趋势，这种 SSR 重复类型的偏好性可能与分析的数据量有关，也可能与其自身长度的稳定性有关。重复类型中三核苷酸重复居多，推测可能与三联体密码子选择作用有关，因为除三、六核苷酸重复之外，其他重复类型重复次数的改变，会导致阅读框的改变，容易造成移码突变，进而影响基因产物[23]。在青稞转录组 SSR 序列中二核苷酸重复以 AG/CT 为主，三核苷酸重复中 CCG/CGG、AGG/CCT 和 AGC/CTG 居多，这与藜麦（AG/CT）[30]、玉米（CCG/GGC 和 AGG/CCT）[17]基本

一致。但是，不同的植物的优势重复基元存在差异，在藏茵陈川西獐牙菜中，二核苷酸重复中的优势基元类型是 AT/TA[23]，在辣椒中 AAC/GTT[31]是三核苷酸重复中的优势重复基元，这可能与植物自身基因组的差异、数据量的大小以及分析数据的来源密切相关。

3.2　青稞转录组中含 SSR 序列的功能注释

通过对青稞转录组中含有 SSR 的 Unigene 在 4 个公共数据库中的比对和功能注释，发现在 GO 注释中主要归类于生物进程下的代谢进程和细胞进程、细胞组分下的细胞和细胞部分以及分子功能下的催化和结合活性。在 COG 注释中，大部分 Unigene 归类于细胞进程及信号传递类下的细胞周期控制、细胞分裂及染色体分隔亚类，信息存储及处理类下的翻译、核糖体结构及生物合成亚类，代谢类下的糖类运输与代谢亚类。另外，在 KEGG 代谢通路注释中，大部分 Unigene 注释到新陈代谢和遗传信息处理类，且在新陈代谢途径中，主要集中在碳水化合物代谢、能量代谢、氨基酸代谢和脂质代谢途径。综合以上注释信息，青稞转录组中含 SSR 的 Unigene 序列主要与生物的基础代谢相关。在注释过程中存在多个含 SSR 的 Unigene 共同注释到相同功能上，出现这种情况不仅因为在一个基因家族中多个基因行使相同的功能，而且也可能是转录本在后期加工过程中存在可变剪接造成的，此外也与软件拼接有关[32]。对转录组 SSR 的应用还需要进行相应的引物筛选等工作，同时，可以有针对性地选择与一定功能相关的基因作为 SSR 标记位点，从而利于目标性状的筛选[32]。

4　结 论

使用 MISA 软件分析了青稞转录组中 SSR 信息，发现青稞转录组中 SSR 出现频率比较高，平均每 6.63 kb 出现一个 SSR 位点，以三核苷酸重复为主要重复类型。对含有 SSR 的 Unigene 进行功能注释，表明青稞转录组中含 SSR 的 Unigene 主要与生物的基础代谢相关。总之，本文基于青稞转录组搜索到的 SSR 类型丰富，生物功能多样，具有很大的利用潜能。

参考文献：

[1]张梅妞，张怀刚，蔡联炳，等. 野生大麦与青稞高分子量谷蛋白亚基遗传变异研究[J]. 西北农业学报，2007，16(1)：107.
ZHANG M N，ZHANG H G，CAI L B，*et al*. Genetic variation of high-molecular-weight glutenin subunits in wild barley and highland barley [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*，2007，16(1)：107.

[2]PURUGGANAN M D，FULLER D Q. The nature of selection during plant domestication [J]. *Nature*，2009，457(7231)：843.

[3]TAKETA S，AMANO S，TSUJINO Y，*et al*. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*，2008，105(10)：4062.

[4]吕远平，熊茉君，贾利蓉，等. 青稞特性及在食品中的应用[J]. 食品科学，2005，26(7)：267.
LÜ Y P，XIONG M J，JIA L R，*et al*. Characteristics of barley and application in food industry [J]. *Food Science*，2005，26(7)：267.

[5]KALIA R K，RAI M K，KALIA S，*et al*. Microsatellite markers：An overview of the recent progress in plants [J]. *Euphytica*，2011，177(3)：309.

[6]黄海燕，杜红岩，乌云塔娜，等. 基于杜仲转录组序列的 SSR 分子标记的开发[J]. 林业科学，2013，49(5)：176.
HUANG H Y，DU H Y，WUYUN T N，*et al*. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eucommia ulmoides* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*，2013，49(5)：176.

[7]杨 菁，迟德钊，吴昆仑，等. 青海省栽培青稞 SSR 标记遗传多样性研究[J]. 安徽农业科学，2010，38(8)：4307.
YANG J，CHI D Z，WU K L，*et al*. Genetic diversity of SSR in cultivated *Hordeum vulgare* L. in Qinghai province [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*，2010，38(8)：4307.

[8]吴昆仑. 青稞种质资源的 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报，2011，31(6)：1030.
WU K L. Genetic diversity analysis of hulless barley germplasm by SSR markers [J]. *Journal of Triticeae Crops*，2011，31(6)：1030.

[9]潘志芬，邹弈星，邓光兵，等. 青藏高原栽培青稞 SSR 标记遗传多样性研究[J]. 中山大学学报(自然科学版)，2007，46(2)：82.
PAN Z F，ZHOU Y X，DENG G B，*et al*. Genetic diversity of SSR markers in cultivated hulless barley from Qinghai-Tibet plateau in China [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*，2007，46(2)：82.

[10]孟亚雄，孟祎林，汪军成，等. 青稞遗传多样性及其农艺性状与 SSR 标记的关联分析[J]. 作物学报，2015，42(2)：180.
MENG Y X，MENG Y L，WANG J C，*et al*. Genetic diversity and association analysis of agronomic characteristics with SSR markers in hulless barley [J]. *Acta Agronomica Sinica*，2015，42(2)：180.

[11]李小白，向 林，罗 洁，等. 转录组测序(RNA-seq)策略及其数据在分子标记开发上的应用[J]. 中国细胞生物学学报，2013，35(5)：723.
LI X B，XIANG L，LUO J，*et al*. The strategy of RNA-seq，

application and development of molecular marker derived from RNA-seq [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2013, 35(5): 723.

[12]GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, *et al*. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644.

[13]PERTEA G, HUANG X, LIANG F, *et al*. TIGR gene indices clustering tools (TGICL): A software system for fast clustering of large EST datasets [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(5): 651.

[14]**蔡年辉, 许玉兰, 徐 杨, 等. 云南松转录组** SSR **的分布及其序列特征**[J]. **云南大学学报(自然科学版)**, 2015, 37(5): 771.
CAI N H, XU Y L, XU Y, *et al*. The distribution and character of SSR sequences in *Pinus yunnanensis* Franch [J]. *Journal of Yunnan University*, 2015, 37(5): 771.

[15] CONESA A, GOTZ S, GARCIA-GOMEZ J M, *et al*. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674.

[16] YE J, FANG L, ZHENG H, *et al*. WEGO: a web tool for plotting GO annotations [J]. *Nucleic acids research*, 2006, 34(supply 2): W293.

[17]THIEL T, MICHALEK W, VARSHNEY R, *et al*. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(3): 414.

[18]KANTETY R V, LA ROTA M, MATTHEWS D E, *et al*. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48(5-6): 504.

[19]CARDLE L, RAMSAY L, MILBOUME D, *et al*. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants [J]. *Genetics*, 2000, 156(2): 850.

[20]**李满堂, 张仕林, 邓 鹏, 等. 洋葱转录组** SSR **信息分析及其多态性研究**[J]. **园艺学报**, 2015, 42(6): 1103.
LI M T, ZHANG S L, DENG P, *et al*. Analysis on SSR information in transcriptome of onion and the polymorphism [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(6): 1103.

[21]LI L, WANG J, GUO Y, *et al*. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat [J]. *Progress in Natural Science*, 2008, 18(12): 1487.

[22]CHOY G, ISHII T, TEMNYKH S, *et al*. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(5): 713.

[23]**刘 越, 岳春江, 王 翊, 等. 藏茵陈川西獐牙菜转录组** SSR **信息分析**[J]. **中国中药杂志**, 2015, 40(11): 2068-2074.
LIU Y, YUE C J, WANG Y, *et al*. Data mining of simple sequence repeats in transcriptome sequences of Tibetan medicinal plant Zangyinchen Swertia mussotii [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(11): 2068-2074.

[24]**王 东, 曹玲亚, 高建平. 党参转录组中** SSR **位点信息分析**[J]. **中草药**, 2014, 45(16): 2390.
WANG D, CAO L Y, GAO J P. Data mining of simple sequence repeats in *Codonopsis pilosula* transcriptome [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(16): 2390.

[25]**李翠婷, 张广辉, 马春花, 等. 野三七转录组中** SSR **位点信息分析及其多态性研究**[J]. **中草药**, 2014, 45(10): 1468.
LI C T, ZHANG G H, MA C H, *et al*. Analysis on SSR loci information in transcriptome of *Panax vienamensis* var. *fuscidiscus* and its polymorphism [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(10): 1468.

[26]**陈 茵, 李翠婷, 姜倪皓, 等. 灯盏花转录组中** SSR **位点信息分析及其多态性研究**[J]. **中国中医药杂志**, 2014, 39(7): 1220.
CHEN Y, LI C T, JIANG N H, *et al*. Analysis on SSR loci information in transcriptome of *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. and its polymorphism [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(7): 1220.

[27]**杨 华, 陈 琪, 韦朝领, 等. 茶树转录组中** SSR **位点的信息分析**[J]. **安徽农业大学学报**, 2011, 38(6): 882.
YANG H, CHEN Q, WEI C L, *et al*. Analysis on SSR information in *Camellia sinensis* transcriptome [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2011, 38(6): 882.

[28]**李炎林, 杨星星, 张家银, 等. 南方红豆杉转录组** SSR **挖掘及分子标记的研究**[J]. **园艺学报**, 2014, 41(4): 735.
LI Y L, YANG X X, ZHANG J Y, *et al*. Studies on SSR molecular markers based on transcriptome of *Taxus chinensis* var. mairei [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(4): 735.

[29]**甘 霖, 覃 碧, 刘实忠, 等. 巴西橡胶树转录组中** SSR **位点的信息分析**[J]. **广东农业科学**, 2014, 41(16): 142.
GAN L, QIN B, LIU S Z, *et al*. Bioinformatic analysis of SSR markers in transcriptome of rubber tree *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(16): 142.

[30]**张体付, 戚维聪, 顾闽峰, 等. 藜麦** EST-SSR **的开发及通用性分析**[J]. **作物学报**, 2016, 42(4): 495.
ZHANG T F, QI W C, GU M F, *et al*. Exploration and transferability evaluation of EST-SSRs in Quinoa [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(4): 495.

[31]**刘 峰, 王运生, 田雪亮, 等. 辣椒转录组** SSR **挖掘及其多态性分析**[J]. **园艺学报**, 2012, 39(1): 171.
LIU F, WANG Y S, TIAN X L, *et al*. SSR mining in pepper (*Capsicum annuum* L.) transcriptome and the polymorphism analysis [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(1): 171.

[32]**何 海, 郭继云, 马毅平, 等. 茯苓转录组** SSR **序列特征及其基因功能分析**[J]. **中草药**, 2015, 46(23): 3563.
HE H, GUO J Y, MA Y P, *et al*. Characterization and gene function analysis of SSR sequences in *Poria cocos* transcriptome [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, 46(23): 3563.