

基于 RNA-seq 技术的奥利亚罗非鱼转录组 SSR 位点信息分析

周康奇¹, 潘贤辉¹, 黄 姻¹, 覃俊奇¹, 徐俊龙², 杜雪松¹, 文露婷¹,
陈 忠¹, 潘志忠¹, 邓 潜¹, 林 勇¹

(1. 广西壮族自治区水产科学研究院/广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室/广西水产良种南繁基地,
广西 南宁 530021; 2. 广西钦州农业学校, 广西 钦州 535000)

摘要: 为了开发奥利亚罗非鱼有关耐盐性的分子标记, 采用二代测序 RNA-seq 方法, 挖掘奥利亚罗非鱼的微卫星标记。结果显示, 拼接组装获得了 71 009 条 Unigenes, 并在所有序列中共发现了 10 875 个 SSR 位点, 含有位点序列的数量为 8 315 条, 占总序列的 11.71%。奥利亚罗非鱼转录组中 SSR 位点类型较为丰富, 共识别到 5 种不同核苷酸重复类型和 126 种不同重复基序。其中, 二核苷酸串联重复单元类型的含量最多(5 779 个), 占总位点数的 53.14%; 而在二核苷酸重复类型中 AC/GT 基序类型出现频率最高(3 954 个, 占 36.36%)。此外, SSR 位点以 6 次重复次数为主(3 048 个), 占总位点数的 27.77%; SSR 位点序列长度分布于 12~254 bp, 其中具有高度多态性位点 3 480 个(占比 29.14%), 中等多态性位点 8 462 个(占比 70.86%)。

关键词: 奥利亚罗非鱼; 转录组; 多态性; SSR 位点信息; RNA-seq

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2020)11-0147-06

Analysis of SSR Site Information in Transcriptome of *Oreochromis aurea* Based on RNA-seq

ZHOU Kangqi¹, PAN Xianhui¹, HUANG Yin¹, QIN Junqi¹, XU Junlong², DU Xuesong¹,
WEN Luting¹, CHEN Zhong¹, PAN Zhizhong¹, DENG Qian¹, LIN Yong¹

(1. Guangxi Academy of Fishery Sciences/Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture/
Guangxi Aquatic Breeding Base, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Qinzhou Agricultural School, Qinzhou 535000, China)

Abstract: In order to develop molecular markers related to salt tolerance in *Oreochromis aurea*, the next-generation sequencing RNA-seq method was used to mine microsatellite tags in *O. aurea*. The results showed that a total of 71 009 unigenes were obtained by splicing and assembly, and a total of 10 875 SSR loci were found in all sequences. The number of sequences contained SSR loci was 8 315, accounting for 11.71% of the total sequences. There were many types of SSR loci in the transcriptome of *O. aurea*, and 5 different nucleotide repeat types and 126 different repeat motifs were recognized. Among them, the content of the dinucleotide tandem repeat unit type was the most, with 5 779, accounting for 53.14% of the total number of sites. And among dinucleotide repeat types AC/GT the motif type had the highest frequency(3 954 times, 36.36%). In addition, SSR loci were dominated by 6 repetitions(3 048), accounting for 27.77% of the total number of loci; SSR loci sequence length was 12—254 bp, of which 3 480 loci were highly polymorphic(29.14%), and 8 462 loci were moderate polymorphic(70.86%).

Key words: *Oreochromis aurea*; Transcriptome; Polymorphism; SSR site information; RNA-seq

收稿日期: 2020-05-24

基金项目: 广西创新驱动发展专项(AA17204080-5)

作者简介: 周康奇(1990-), 女, 贵州都匀人, 实习研究员, 硕士, 主要从事水产动物遗传繁育与资源增殖研究。

E-mail: 2472797247@qq.com。潘贤辉为同等贡献作者

通信作者: 林 勇(1969-), 男, 广西玉林人, 研究员, 本科, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: linnn2005@126.com

微卫星 (Microsatellite) 或称简单序列重复 (Simple sequence repeats, SSR), 具有分布广泛、多态性高、共显性遗传以及扩增稳定等优点, 被广泛应用于物种遗传育种、种质资源评定、遗传图谱构建和数量性状座位 (Quantitative trait locus, QTL) 分析等研究领域^[1-2]。高度可变的微卫星区域可以提供更加精细的群体水平动态变化的分辨率, 适合用于保护遗传学、种质资源鉴定、种群遗传多样性、种群关系、性状遗传分析和进化等研究^[3-4]。与传统 SSR 分析方法相比, RNA-seq 二代测序技术具有便捷、高效、通量大等优势, 目前已成为大规模开发 SSR 标记的有效方法, 已在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[5]、黄姑鱼 (*Nibea albiflora* Richardson)^[6]、黄唇鱼 (*Bahaba flavelabata*)^[7]、银鲳 (*Xenocypris argentea*)^[8] 等鱼类上广泛应用。

奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aurea*) 隶属于鲈形目 (Perciformes)、丽鱼科 (Cichlidae)、罗非鱼属 (*Oreochromis*), 是罗非鱼中的大型种类, 因其具有适盐性广、生长快、易繁殖、肉质鲜嫩等优势, 备受广大消费者和养殖户的喜爱, 如今是罗非鱼主要养殖品种之一^[9]。目前, 关于奥利亚罗非鱼的研究多在遗传结构和核型分析^[10-11]、性别机制探索^[12-14]、耐寒性能^[15]、肉质营养评价^[16-17] 等方面, 但也有少数学者对奥利亚罗非鱼不同盐度条件下的养殖进行了研究, 研究发现奥利亚罗非鱼可以在低于 20‰ 盐水中生存, 且日增体质量超过 1 g^[18-19]。据此, 有学者认为只要控制好养殖条件, 可以在盐水中养殖奥利亚罗非鱼, 并能获得较好品质 and 经济效益^[18-19]。

目前, 在海南、广西、广东等沿海地区, 已有养殖户在天然海水中成功养殖奥利亚罗非鱼, 并取得良好的经济效益^[20]。耐盐罗非鱼传统选育存在培育周期长、投入成本高等瓶颈问题, 因此, 结合现代生物分子技术选育耐盐罗非鱼成为一种高效选育手段。为此, 笔者所在课题组采用 RNA-seq 测序方法, 结合生物信息学分析方法挖掘有关奥利亚罗非鱼耐盐性能的微卫星分子标记, 同时深入探讨其组成特点与分布规律, 旨在为开发有效的辅助育种分子标记奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

在广西水产科学研究院的广西水产良种南繁基地开展为期 3 个月盐度养殖试验, 从盐度组中随机

选取 30 尾奥利亚罗非鱼, 取其肝脏和脾脏组织置于 RNA 保护液中 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], -80 ℃ 保存备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 文库构建

根据 Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国) 的操作说明提取总 RNA。RNA 完整性和浓度分别通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 2100 安捷伦生物分析仪 (Agilent 公司, 美国) 进行检测。当 RNA 完整性数 (RIN) 大于 8, 且存在完整 28S 和 18S 核糖体条带时, 可用于构建 RNA-seq 文库。等量混合每个个体 RNA 样品后, 按照 LI 等^[21] 的方法进行 cDNA 文库的构建。

1.3 RNA 测序和拼接组装

利用 Illumina HiSeq 4000 测序平台 (广州基迪奥生物科技有限公司, 中国) 进行高通量测序。并通过 Assembly A Perl 程序对 Raw data 转录组进行过滤, 去除接头序列和低质量的 Reads (基础质量 < 20)。采用 Trinity 软件组装方法对序列进行拼接获得转录组序列, 然后所有测序读段通过 De novo 组装产生单一序列和重叠群。

1.4 SSR 位点分析和筛选

按照以下配置参数使用软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 对转录组的所有 Unigene 进行搜索, 并鉴定 SSR。配置参数信息: 二核苷酸重复单元重复次数 ≥ 6 次, 三核苷酸单元则重复数 ≥ 5 次, 四、五和六核苷酸单元重复次数 ≥ 4 次; 同时, 2 个 SSR 序列的距离短于 100 bp 则合并作为 1 个 SSR 位点处理。

2 结果与分析

2.1 奥利亚罗非鱼转录组中 SSR 的数量及分布

将初始 reads 进行严格数据质控获得高质量 clean reads 共 41 292 300 个, 平均 GC 含量为 48.94%, Q20 和 Q30 碱基百分比分别超过 98.88% 和 94.80%, 表明本研究中 RNA-seq 测序所得数据质量良好。通过组装、聚类 and 拼接, 取得了平均长度为 1 097 bp, 共计 71 009 条的 Unigenes 序列, 合计全长为 77 936 593 bp。

运用 MISA 软件对获得的所有 Unigenes 序列进行 SSR 位点检索, 共发现了 10 875 个 SSR 位点, 含有 SSR 位点的 Unigenes 序列 (约占 11.71%) 有 8 315 条。其中, 含有 SSR 位点 1 个以上序列数量有 1 844 条, 存在复合形式的 SSR 位点数量有 821

个。此外,在奥利亚罗非鱼转录组中存在较为丰富的 SSR 位点类型,共发现 5 种核苷酸重复类型(即二到六个核苷酸重复),但是不同核苷酸重复类型的占比差异比较大,二、三和四核苷酸的 SSR 位点类型占总位点数的 95.90%,而五、六核苷酸 SSR 位点数量占比只有 4.10%。其中,数量最多的是二核苷酸 SSR 位点,为 5 779 个,约占总数的 53.14%;三核苷酸和四核苷酸 SSR 位点个数分别为 3 281 个(30.17%)和 1 369 个(12.59%);五核苷酸和六核

苷酸 SSR 位点数量很少,分别为 389 个(3.58%)和 57 个(0.52%)。另外,从 5 个类型的 SSR 位点的序列长度上看,从大到小依次为二、三、四、五和六核苷酸,每种类型位点的平均长度是 20.12 bp,每种类型的 SSR 位点平均长度分别是 23.49、15.15、17.21、21.92、22.84 bp(表 1)。从整体分布来说,奥利亚罗非鱼转录组中每 1 个 SSR 位点平均相距约 7.17 kb,即平均分布密度约为 139 个/Mb SSR 位点。

表 1 奥利亚罗非鱼 SSR 位点的分布情况

Tab. 1 Distribution of SSR loci in *Oreochromis aurea* transcriptome

重复类型 Repeat type	数量/个 Number	占比/% Percentage	频率/% Frequency	平均距离/kb Average distance	平均长度/bp Average length	总长度/bp Overall length
二核苷酸 Dinucleotide	5 779	53.14	8.14	13.49	23.49	135 769
三核苷酸 Trinucleotide	3 281	30.17	4.62	23.75	15.15	49 719
四核苷酸 Tetranucleotide	1 369	12.59	1.93	56.93	17.21	23 556
五核苷酸 Pentanucleotide	389	3.58	0.55	200.35	21.92	8 525
六核苷酸 Hexanucleotide	57	0.52	0.08	1 367.31	22.84	1 302
总计 Total	10 875	100.00	15.31	7.17	20.12	218 871

按照 WEBER^[22] 的分类方法可在奥利亚罗非鱼转录组中找到 5 种完美型的 SSR 位点,即完美二碱基重复(p2)、完美三碱基重复(p3)、完美四碱基重复(p4)、完美五碱基重复(p5)和完美六碱基重复(p6)类型,其中 p2、p3 分布数量最多,分别为 91.35、49.64 kb,其次是 p4、p5,分别为 23.16、8.45 kb,而 p6 数量最少为 1.28 kb,完美型 SSR 位点数约 0.01 个/Mb。

2.2 奥利亚罗非鱼转录组 SSR 特点

依据奥利亚罗非鱼转录组中的不同类型 SSR 位点重复次数分布,发现 6 次重复数量最多,有 3 048 个 SSR 位点,占总数的 27.77%;其次是 5 次重复数,达 2 292 个,占总数的 20.89%;而 7 次重复数(1 500 个,13.67%)和 4 次重复数(1 260 个,11.48%)分别位于第 2 和第 4(表 2)。统计 4~14 次重复数的位点共存在 10 189 个,占总位点数的

92.85%,而大于或等于 15 次重复数位点合计 785 个,占比 7.15%。

另外,统计奥利亚罗非鱼转录组中 SSR 重复类型出现频率,结果显示,在总 SSR 位点中共有 126 个不同串联重复单元类型,从二核苷酸到六核苷酸重复类型分布依次是 4、10、29、50、33 种类型。其中,AC/GT 和 AG/CT 二核苷酸类型各出现 3 954 次和 1 116 次,具有明显优势,分别占总 SSR 位点数量的 36.36%和 10.26%;三核苷酸类型中以 AGG/CCT 重复类型最多,共出现 749 次,约占总数的 6.89%,随后依次是 AGC/CTG 和 AAT/ATT 类型,各出现 571 次(5.25%)和 503 次(4.63%);而四核苷酸和五核苷酸类型分别以 AAAC/GTTT(441 次,4.06%)和 AAAAC/GTTTT(91 次,0.84%)重复类型为主。剩余重复单元类型出现次数和频率均比较低(图 1)。

表 2 奥利亚罗非鱼转录组中不同类型 SSR 位点的重复次数分布

Tab. 2 Distribution of repetition number of different types of SSR loci in *Oreochromis aurea* transcriptome

重复类型 Repeat type	重复次数 Number of repeat											
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	≥15
二核苷酸 Dinucleotide	0	0	2 189	1 086	671	452	339	157	36	1	87	761
三核苷酸 Trinucleotide	0	1 962	751	346	74	29	65	8	8	14	11	13
四核苷酸 Tetranucleotide	923	261	71	59	16	2	6	7	6	4	4	10
五核苷酸 Pentanucleotide	281	61	31	0	2	5	3	2	2	0	1	1
六核苷酸 Hexanucleotide	52	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
总计 Total	1 260	2 292	3 048	1 500	771	497	423	185	64	32	117	785
百分比 Percentage	11.48	20.89	27.77	13.67	7.03	4.53	3.85	1.69	0.58	0.29	1.07	7.15

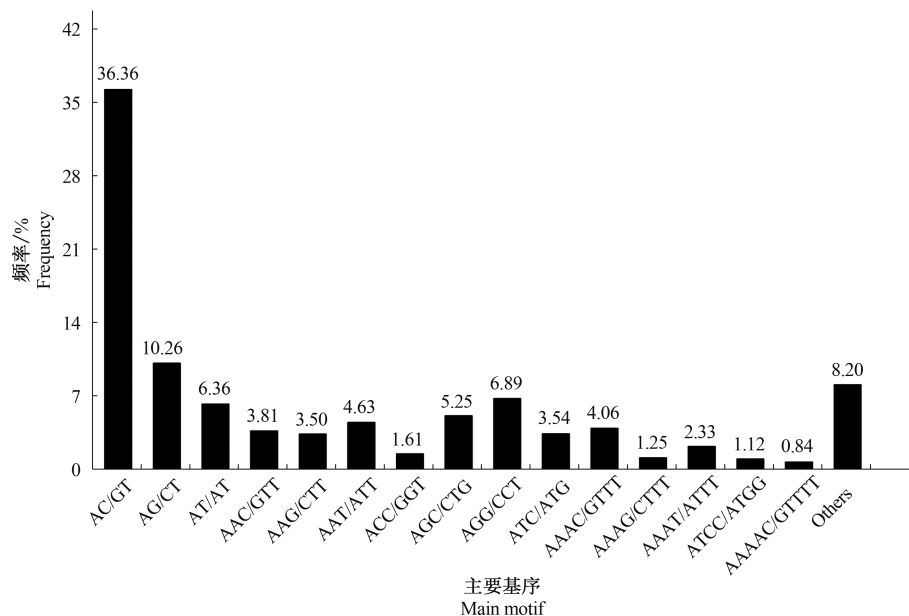


图 1 奥利亚罗非鱼转录组中 SSR 主要重复单元的类型及出现频率

Fig. 1 Types and frequency of SSR major repeat units in *Oreochromis aurea* transcriptome

2.3 奥利亚罗非鱼转录组 SSR 多态性评价

通过分析奥利亚罗非鱼 SSR 位点长度分布发现,所统计的 SSR 位点均分布在 12~254 bp,其中,长度在 12~20 bp(不含 20 bp)的位点个数最多,为 8 462 个(占比 70.86%);而处于 20 bp 以上(含 20 bp)的 SSR 位点个数为 3 480 个,占总数的 29.14%。此外,本研究未发现长度小于 12 bp 的 SSR 位点。依据 TEMNYKH 等^[23]的研究,可将 SSR 位点区分为 I 和 II 类,即 I 类为高度多态性(碱基数 ≥ 20 bp);II 类则为中等多态性($12 \text{ bp} \leq \text{碱基数} < 20 \text{ bp}$)。推测奥利亚罗非鱼转录组中 SSR 位点以中等多态性为主,其次是高度多态性。这 2 种类型的 SSR 位点均具有较高开发利用价值。

3 结论与讨论

本研究通过 RNA-seq 二代测序技术对无参物种奥利亚罗非鱼的转录组进行 SSR 位点分析,在 71 009 条 Unigenes 上识别到 10 875 个 SSR 位点,不含单核苷酸类型位点。统计分析发现,奥利亚罗非鱼转录组中含有 SSR 位点的 Unigenes 数量占总数的 11.71%,低于黄唇鱼(30.23%)^[7]和牙鲆(27.12%)^[5],高于鳊鱼(*Lota lota*)(10.27%)^[24]和银鲳(*Pampus argenteus*)(2.62%)^[25],说明奥利亚罗非鱼转录组中含有 SSR 位点较为丰富。另外,本研究还评估了 SSR 位点在 Unigene 上平均分布距离为 7.17 kb,远大于牙鲆(2.95 kb)^[5]、巨鲈(*Siluriformes;Sisoridae*)(2.0 kb)^[26]和鳊鱼(4.25 kb)^[24],表明未统计单核苷酸数量影响了奥利亚罗非鱼转录

组中的 SSR 位点分布密度。从 SSR 位点多态性来看,本研究发现了 29.14% 的 I 类高度多态性和 70.86% 的 II 类中等多态性位点,而未发现极低多态性位点($< 12 \text{ bp}$)。李超等^[5]运用 RNA-seq 测序技术在牙鲆转录组中共识别 I 类、II 类和极低多态性 SSR 位点,3 类位点占比依次为 65.10%、21.84% 和 13.05%。刘磊等^[25]在银鲳转录组中获得了 45.06% 的 I 类位点,31.89% 的 II 类位点和 23.05% 的极低多态性位点。依据本研究结果,推测奥利亚罗非鱼转录组中所含 SSR 位点多态性属于中等以上水平^[27]。同时,经过多态性数据比较发现,在进行转录组 SSR 位点检测时不记录单核苷酸重复单元类型位点可以避免筛选到极低多态性位点,但也漏选了部分中高等多态性的单核苷酸位点。大部分研究者将重复单元的重复次数高低作为评价 SSR 位点多态性的重要指标之一,在奥利亚罗非鱼转录组中 6 次重复出现频率最高,而后随着重复次数的增加,SSR 位点数量呈现下降趋势。有学者认为,SSR 位点重复次数发生变化,是 SSR 位点序列在 DNA 复制过程中出现滑移导致原序列长度增加而形成的,这可能在物种进化过程中受到了自然选择压力的作用^[28-29]。而对于基因结构而言,重复次数的不断变化会导致基因序列上碱基的移码突变,进而直接影响基因功能,这也是目前物种进化、遗传变异等研究内容中的热点话题。

在对奥利亚罗非鱼转录组中的 SSR 位点进行分析发现,二核苷酸 AC/GT 重复基元类型占主要优势(36.36%),其次是 AG/CT 重复类型(10.26%)。

类似的研究结果在其他鱼类上也有发现,前人采用 EST-SSR 分子标记检测技术对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 进行研究,发现 AC/GT 类型的 SSR 位点分布最广(分别为 60.19% 和 50.30%),AG/CT 类型次之(分别为 28.16% 和 40.40%)^[30-31];LI 等^[32]运用 RNA-seq 测序技术在大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 上进行研究,结果表明,AG/CT 类型出现频率高(18.17%),其次为 AG/CT(10.42%)。以上结果说明,AC/GT 和 AG/CT 重复单元类型普遍存在鱼类中,但这种相似结果出现的原因还有待进一步探索。此外,本研究中,三核苷酸以 AGG/CCT、AGC/CTG 和 AAT/ATT 等 3 种重复单元类型为主,而在不同的鱼类上三核苷酸的主要重复类型存在差异,如在银鲳上是以 AAT/CAG、GAG/AAC 和 AAT/CCT 为主^[25];在牙鲆上则以 AGC、AAG 和 AAT 为主^[33];在半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 主要分布着 AAT、AAG 和 AAC 重复单元类型^[34]。这表明三核苷酸重复基序除了形成了不同的 DNA 结构外,还可能在重复的起源中产生物种特异性细胞因子^[29]。

综上,本研究运用 RNA-seq 测序技术首次对奥利亚罗非鱼转录组进行鉴定获得了一批中等水平以上的多态性 SSR 位点标记,运用性高、位点类型丰富、覆盖了整个奥利亚罗非鱼的基因组;而且对奥利亚罗非鱼 SSR 位点的分布特征进行了归纳统计分析,为奥利亚罗非鱼遗传连锁图谱构建、遗传结构分析等遗传学研究奠定了坚实的基础。同时,为奥利亚罗非鱼耐盐家系人工辅助育种分子标记开发提供了可靠的数据资料。

参考文献:

- [1] NARASIMHAMOORTHY B, SAHA M, SWALLER T, et al. Genetic diversity in switchgrass collections assessed by EST-SSR markers [J]. *Bioenergy Research*, 2008, 1 (2): 136-146.
- [2] GONG L, STIFT G, KOFLER R, et al. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117(1): 37-48.
- [3] YE H, REN P, ZHAO G, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 31(4): 149-153.
- [4] YE H, WANG X, GAO T, et al. EST-derived microsatellites in *Pseudosciaena crocea* and their applicability to related species [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 29 (6): 83-91.
- [5] 李超,侯吉伦,王桂兴,等. 基于牙鲆 RNA-seq 数据中 SSR 标记的信息分析 [J]. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 122-127.
- [6] LI C, HOU J L, WANG G X, et al. Bioinformatic analysis of SSR markers in transcriptomic sequencing *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine fishery*, 2015, 37(2): 122-127.
- [7] 龚诗琦,王志勇,肖世俊,等. 黄姑鱼转录组 SSR 的开发与验证 [J]. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2016, 21 (4): 241-246.
- [8] GONG S Q, WANG Z Y, XIAO S J, et al. Development and verification of SSR based on transcriptome of yellow drum, *Nibea albiflora* [J]. *Journal of Jimei University (Natural Science Edition)*, 2016, 21(4): 241-246.
- [9] 赵彦花,区又君,温久福,等. 基于转录组测序技术的黄唇鱼 SSR 分子标记筛选 [J]. *南方农业学报*, 2019, 50(9): 2078-2087.
- [10] ZHAO Y H, QU Y J, WEN J F, et al. Development of SSR markers in *Bahaba flavolabiata* by transcriptome sequencing [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(9): 2078-2087.
- [11] 赵良杰,彭新亮,郭旭升. 基于转录组数据的银鲳微卫星位点筛选 [J]. *淡水渔业*, 2018, 48(4): 23-29.
- [12] ZHAO L J, PENG X L, GUO X S, et al. Screening of microsatellite markers in *Xenocypris argentea* using transcriptome sequencing [J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(4): 23-29.
- [13] 肖俊,甘西,罗永巨. 罗非鱼育种研究进展 [J]. *湖南科技大学学报 (自然科学版)*, 2014, 29(1): 106-112.
- [14] XIAO J, GAN X, LUO Y J. The progress of tilapia breeding [J]. *Journal of Hunan University of Science & Technology (Natural Science)*, 2014, 29(1): 106-112.
- [15] 王金龙,杨弘,吴婷婷,等. 奥利亚罗非鱼 (♀) × 鳊 (♂) 远缘杂交子代的遗传结构 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 32-38.
- [16] WANG J L, YANG H, WU T T, et al. Genetic constitutions of distant hybridization offsprings between *Oreochromis aurea* (♀) × *Siniperca chuatsi* (♂) [J]. *Chinese Fisheries Science*, 2007, 14(1): 32-38.
- [17] 万松良,策金华,任炳琛,等. 奥利亚罗非鱼 (WZ ♀) × 尼罗罗非鱼 (XY ♂, YY ♂) 杂交子代的性比分析 [J]. *水产学杂志*, 2018, 31(3): 14-19.
- [18] WANG S L, JIA J H, REN B S, et al. Sex ratio analysis of hybrid F₁ from female blue tilapia *Oreochromis aureus* (WZ ♀) × male Nile tilapia *O. niloticus* (XY ♂, YY ♂) crosses [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(3): 14-19.
- [19] 樊征. 奥利亚罗非鱼性别连锁分子标记的筛选 [D]. 重庆:西南大学, 2018.
- [20] FAN Z. Identification and validation of sex-linked markers in blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [21] 曹丽萍,俞菊华,殷国俊,等. 奥利亚罗非鱼 *SOX9* 基因 cDNA 全长的克隆及分析 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(1): 6-11.
- [22] CAO L P, YU J H, YIN G J, et al. The cloning and analysis of *SOX9* gene derived from *Oreochromis aureus* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(1):

- 6-11.
- [14] 王光花. 奥利亚罗非鱼 *DMRT1* 基因的克隆及其性别决定机制的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
WANG G H. Molecular cloning and analysis of *DMRT1* of *Oreochromis aureus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2004.
- [15] 杜雪松, 林勇, 梁国琨, 等. 两种罗非鱼的耐寒性能比较[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2019, 37(3): 174-179.
DU X S, LIN Y, LIANG G K, et al. Comparison of low temperature resistant performance between two tilapia [J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2019, 37(3): 174-179.
- [16] 郝淑贤, 李来好, 杨贤庆, 等. 5 种罗非鱼营养成分分析及评价[J]. 营养学报, 2007, 29(6): 614-615.
HAO S X, LI L H, YANG X Q, et al. Analysis and evaluation of nutrient composition of five tilapias [J]. Journal of Nutrition, 2007, 29(6): 614-615.
- [17] 强俊, 杨弘, 徐跑, 等. 吉富罗非鱼与奥利亚罗非鱼完全双列杂交后代生长性能与肌肉营养成分的比较[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 654-665.
QIANG J, YANG H, XU P, et al. Comparative study of the growth and nutrient composition of muscle tissue of two species of tilapia and their reciprocal hybrids [J]. Chinese Fisheries Science, 2015, 22(4): 654-665.
- [18] 胡国宏. 养在海水网箱中的罗非鱼在不同放养密度下的产量[J]. 国外水产, 1994(1): 19-23.
HU G H. Yield of tilapia in seawater cages at different stocking densities [J]. Foreign Aquatic Products, 1994(1): 19-23.
- [19] 李学军, 李爱景, 李思发, 等. 新引进萨罗罗非鱼与其它 8 种罗非鱼耐盐差异[J]. 水产学报, 2010, 34(7): 1072-1079.
LI X J, LI A J, LI S F, et al. Differences of salt-tolerance between *Sarotherodon melanotheron* and the other 8 tilapias [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(7): 1072-1079.
- [20] 余艳玲, 张永德. 罗非鱼的耐盐性能及研究进展[J]. 农业研究与应用, 2014(1): 60-68.
YU Y L, ZHANG Y D. Salt tolerance and research progress of tilapia [J]. Agricultural Research and Application, 2014(1): 60-68.
- [21] LI P, DENG W Q, LI T H, et al. Illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of *Amanita exitialis basidiocarps* [J]. Gene, 2013, 532(1): 63-71.
- [22] WEBER J L. Informativeness of human (dC-dA) n. (dG-dT) n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7(4): 524-530.
- [23] TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential [J]. Genome Research, 2001, 11(8): 1441-1452.
- [24] 孟玮, 蒋艳琳, 张林, 等. 基于 RNA-seq 技术的江鳕转录组 SSR 位点信息分析[J]. 淡水渔业, 2019, 49(6): 10-14.
MENG W, JIANG Y L, ZHANG L, et al. SSR loci information analysis in the transcriptome of Burbot (*Lota lota*) based on RNA-seq [J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(6): 10-14.
- [25] 刘磊, 彭士明, 高权新, 等. 基于银鲴 RNA-seq 数据中 SSR 标记的信息分析[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(28): 102-105.
LIU L, PENG S M, GAO Q X, et al. Bioinformatic analysis of SSR markers based on RNA-seq of *Pampus argenteus* [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(28): 102-105.
- [26] DU M, LI N, NIU B, et al. De novo transcriptome analysis of *Bagarius yarrelli* (Siluriformes: Sisoridae) and the search for potential SSR markers using RNA-Seq [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0190343.
- [27] DREISIGACKER S, ZHANG P, WARBURTON M, et al. SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different mega environments [J]. Crop Science, 2004, 44(2): 381-388.
- [28] SIA E A, KOKOSKA R J, DOMINSKA M, et al. Microsatellite instability in yeast: Dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes [J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(5): 2851-2858.
- [29] TÓTH G, GÁSPÁRI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis [J]. Genome Research, 2000, 10(7): 967-981.
- [30] WANG D, LIAO X, CHENG L, et al. Development of novel EST-SSR markers in common carp by data mining from public EST sequences [J]. Aquaculture, 2007, 271(1): 558-574.
- [31] 李偲, 刘航, 黄容, 等. 草鱼 I 型微卫星标记的发掘及其多态性检测 [J]. 水生生物学报, 2011, 35(4): 681-687.
LI S, LIU H, HUANG R, et al. Identification of type I microsatellite markers and their polymorphism in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Hydrobiology, 2011, 35(4): 681-687.
- [32] LI C, LING Q, GE C, et al. Transcriptome characterization and SSR discovery in large-scale loach *Paramisgurnus dabryanus* (Cobitidae, Cypriniformes) [J]. Gene, 2015, 557(2): 201-208.
- [33] YU H, JIANG L, CHEN W, et al. Analysis of new microsatellite markers developed from reported sequences of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Ocean University of China, 2010, 9(4): 365-370.
- [34] LIU Y, BAO B, CHEN S, et al. Analysis of SSRs derived from an EST library of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* [J]. Journal of Ocean University of China, 2008, 7(3): 339-342.