

# 基于银鲳 RNA-seq 数据中 SSR 标记的信息分析

刘磊<sup>1,2</sup>, 彭士明<sup>1</sup>, 高权新<sup>1</sup>, 张晨捷<sup>1</sup>, 施兆鸿<sup>1,2\*</sup> (1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要** [目的] 开发银鲳分子标记技术。[方法] 通过对银鲳(*Pampus argenteus*) 进行高通量转录组测序(RNA-seq) 获得银鲳转录组原始试验数据, 经过拼接后, 获得 3 715 603 条 unigene 序列。采用生物信息学分析软件 MISA 对所有 unigene 进行简单重复序列(simple sequence repeat, SSR) 位点鉴定。同时, 利用软件对银鲳转录组 SSR 的多态性进行评价。[结果] 银鲳转录组水平上, 共鉴定出 107 007 个 SSR 位点, 分布在 97 289 条 unigene 中, 发生频率为 2.62%, SSR 平均密度为 476 个/Mbp。在银鲳转录组 SSRs 中, 单核苷酸与二核苷酸重复序列为主要重复类型, 分别占总 SSRs 的 48.14% 和 34.10%。银鲳转录组数据中 SSR 序列共包括 424 种重复基元类型, 单核苷酸重复基元 A 占较高比例, 占同一重复类型 SSRs 的 49.57%, 二核苷酸重复基元 TG/AC 和三核苷酸重复基元 GAG/AAC 是优势重复基元, 分别占同一重复类型 SSRs 的 42.43% 和 9.61%。重复序列长度在 12 bp 以上的 SSR 标记位点数占总 SSR 的 76.95%, 具有丰富的多态性。[结论] 银鲳 SSRs 位点具有极大的可开发性, 可为银鲳遗传多样性研究、遗传图谱构建及分子辅助育种提供有效工具。

**关键词** 银鲳; 转录组测序; SSR 标记

中图分类号 S965.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)28-0102-04

## Bioinformatic Analysis of SSR Markers Based on RNA-seq of *Pampus argenteus*

LIU Lei<sup>1,2</sup>, PENG Shi-ming<sup>1</sup>, GAO Quan-xin<sup>1</sup>, SHI Zhao-hong<sup>1,2\*</sup> et al (1. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090; 2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** [Objective] To develop molecular marker technology of *Pampus argenteus*. [Method] Transcriptomic sequencing was performed for molecular marker technology development on *Pampus argenteus*, and 3 715 603 unigene was found after assembling. The Microsatellite (MISA) software was used to identify SSRs from unigenes. Meanwhile, SSR polymorphisms were evaluated using software. [Result] 107 007 SSRs were identified, distributed in 97 289 unigenes, which accounted for 2.62% of the whole unigenes and the distribution density of the transcriptomic SSRs from transcriptome were 476/Mbp. The nucleotides were repeated and the dinucleotide were the maintypes, accounting for 48.14% and 34.10%, respectively, of all the SSRs. In total, we found 424 different types of repeat motifs, in which the repeats with A, TG/AC and GAG/AAC as the most frequent motifs, accounting for 49.57%, 42.43% and 9.61%, respectively, of the SSR repeat motifs. Statistics got from repetitive sequence length more than 12 bp SSR markers accounting for 76.95% of all the SSRs, it was very rich polymorphism. [Conclusion] The study also assessed the potential of the transcriptomic SSRs for further use and research. These results provide a useful tool for studies in genetic diversity, genetic mapconstruction and molecular assisted breeding of *Pampus argenteus*.

**Key words** *Pampus argenteus*; RNA-seq; SSR marker

SSR (Simple Sequence Repeat) 标记, 又称微卫星 DNA, 是目前最常用的微卫星标记之一。由于 SSR 标记与其他分子标记相比, 具有保守性高、多态性丰富、共显性遗传以及在基因组中分布广泛等特点<sup>[1]</sup>, 近年来在构建动物遗传图谱<sup>[2]</sup>、种质鉴定<sup>[3-4]</sup>、基因定位<sup>[5]</sup>、遗传多样性分析<sup>[6]</sup>、分类与进化<sup>[7-8]</sup> 以及分子标记辅助育种<sup>[9]</sup> 等领域被广泛应用。目前在水生动物研究中, 已经对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[10]</sup>、二长棘鲷 (*Parargyrops edata*)<sup>[11]</sup>、兴国红鲤 (*Cyprinus carpio* var. *singunensis*)<sup>[12]</sup>、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[13]</sup> 等品种进行了转录组测序, 并基于测序结果对所得数据进行了深入分析。

银鲳 (*Pampus argenteus*) 属鲈形目鲳亚目鲳科鲳属, 为暖温性近海中下层鱼类, 分布于印度洋、印度—太平洋、朝鲜和日本西部海域, 在我国沿海地区均有分布, 是主要的捕捞鱼种之一, 属名贵食用鱼类。目前国内外已经开展了银鲳繁育和养殖研究<sup>[14-16]</sup>。近年来不论是养殖还是自然海域捕捞的

银鲳, 均出现个体小型化的现象, 种质资源有衰退迹象; 长期累代的养殖也会导致遗传性状单一; 同时我国沿海分布的银鲳, 不仅形态上存在差异, 而且对环境的适应性也有很大不同。因此, 开展银鲳转录组 SSR 的多态性研究具有重要的理论和现实意义。笔者基于银鲳 RNA-seq 数据中 SSR 标记的信息, 通过对养殖银鲳群体转录组测序, 从其分布特点、频率及多态性方面分析银鲳微卫星在总 RNA 水平的分布特点, 以期对银鲳基因克隆、遗传图谱构建、遗传多样性分析等提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 银鲳取自上海市水产研究所启东基地, 为中国水产科学研究院东海水产研究所自行繁育的 1 龄银鲳, 从养殖池中随机捞取 5 尾, 平均体重为 (18.8 ± 7.2) g, 平均体长为 (9.1 ± 1.1) cm。采样时间为 2015 年 8 月。

**1.2 RNA 提取及 cDNA 文库构建** 银鲳解剖后分别取肝脏组织装入冻存管内, 加入 RNA 保存液于 -80 °C 冰箱保存。银鲳肝脏组织总 RNA 提取参照 Aidlab 公司的 RNAPure 超总 RNA 快速提取试剂盒操作说明书进行。总 RNA 质量和数量经安捷伦生物分析仪 2100 (Agilent)、紫外分光光度计 Bioanalyzer 2000 进行检测, RNA 完整数大于 8.0 即可用于后续 cDNA 文库构建。

**1.3 RNA 测序及组装** 利用 HiSeq™ 2500 测序仪对构建的

**基金项目** 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目 (东 2014Z02-3); 国家科技支撑项目 (2011BAD13B01)。

**作者简介** 刘磊 (1990-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向: 海水鱼类养殖生物学。\* 通讯作者, 研究员, 从事海水鱼类养殖方面的研究。

**收稿日期** 2016-08-17

银鲟 cDNA 进行转录组测序,5 个被测序的样本总计获得 27 G 的原始数据,测序共获得 347 435 132 条原始读数,去除质量较低以及重复的原始读数后,得到 338 525 690 条纯净读数。使用转录组 de novo 组装软件 Trinity 对纯净读数进行组装,并进行去冗余处理和进一步拼接,共获得 3 715 603 条 unigene 序列。

**1.4 SSR 标记筛选** 通过 SSR 分析软件 MicroSAteellite(MISA)对 3 715 603 条 unigene 序列进行 SSR 搜索,设定筛选条件:1~6 bp 的 SSR 单元长度,其序列总长度 $\geq 10$  bp,单碱基的重复单元数 $\geq 10$ ,二碱基的重复次数 $\geq 6$ ,三、四、五、六碱基重复次数 $\geq 5$ 。

**1.5 数据分析** 利用 Excel 对银鲟转录组 SSR 数据进行分类统计分析。

## 2 结果与分析

**2.1 银鲟转录组中 SSR 位点的数量与分布** 使用软件对组装所得的 3 715 603 条 unigene 序列进行比对筛选,结果发现 97 289 条 unigene 序列符合 SSR 序列的条件,发生频率(含有 SSR 的 unigene 数目/总 unigene 数目)为 2.62%。在这些

unigene 序列中有 76 774 条包含单一 SSR 位点,占含有 SSR 序列条数的 78.91%,剩余的 20 515 条 unigene 的 SSR 位点数目均超过 1 个,占含有 SSR 序列条数的 21.09%。

共鉴定发现 107 007 个 SSR 位点,重复单元数目为 424 种,在这些类型的重复单元中,数量最多的 SSR 类型是五核苷酸单元,为 152 种,其次为四核苷酸和三核苷酸碱基单元,分别含有 143 和 59 种(表 1)。微卫星的平均覆盖深度(鉴定出的微卫星个数/unigene 总数)为 2.88%,有 15 233 个 SSR 的存在形式为复合形,占总 SSR 数量的 14.24%。平均距离(银鲟转录所得的 unigene 总长度/微卫星数量)是最佳体现密度的参数,平均每 2.10 kbp 出现 1 个 SSR,即平均密度为 476 个/Mbp。

银鲟转录组中含有大量的 SSR,但不同种类核苷酸组成的 SSR 总量存在较大差异。在这 6 种类型中,SSR 数目最多的是单碱基单元组成的重复形成,为 51 510 个,所占比例为 48.14%,二、三、四、五、六碱基重复类型的 SSR 数量依次递减,重复形式最少的 SSR 是六碱基重复,仅有 100 个,占总 SSR 的比例为 0.09%(表 1)。

表 1 SSR 在银鲟转录组中的出现频率

Table 1 Occurrence frequency of SSR in transcriptomic sequencing of *P. argenteus*

SSR 类型 SSR type	种类 Species	总数 Amount	比例 Proportion %	对应条数 Number of mapped unigene	发生频率 Occurrence frequency %	频率最小单元 Frequency of minimum motifs		频率最大单元 Frequency of maximum motifs	
						数量 Number 个	类型 Type	数量 Number 个	类型 Type
单碱基 Nucleotides	4	51 510	48.14	39 777	46.74	572	C	25 532	A
二碱基 Dinucleotides	12	36 492	34.10	29 776	34.98	5	CG	7 862	TG
三碱基 Trinucleotides	59	15 752	14.72	12 873	15.13	1	CGT	857	GAG
四碱基 Tetranucleotides	143	2 684	2.51	2 228	2.62	—	—	222	AAAC
五碱基 Pentanucleotides	152	469	0.44	371	0.43	—	—	15	AAAAG
六碱基 Hexanucleotides	54	100	0.09	85	0.10	—	—	7	CTC-CTG
合计 Total	424	107 007	100.00	85 110	100.00			35 073	

**2.2 银鲟转录组 SSR 的特点** 从 SSR 类型单元重复次数可以看出,发生频率最高的是 6~10 次重复,此区间内的 SSR 数量为 46 539 个,占 SSR 总数的 43.49%;其次为 11~15 次重复,有 32 473 个 SSR,占 30.35%;5 次重复的 SSR 有 8 394 个,占 7.84%;所占比例较低的类型是 25 次以上重复的 SSR,所占比例仅为 3.62%(表 2)。表明随着同一重复类型 SSR 重复次数的增加 SSR 总数目呈递减趋势。

从出现频率(不同重复类型 SSR 数目/含有 SSR 的 unigene 数量)的角度研究发现,出现频率在不同类型 SSR 重复中差异较明显,出现频率最高的是单核苷酸重复,所占比例为 52.95%;其次是二碱基和三碱基重复,分别为 37.51% 和 16.19%;四、五、六碱基重复出现的频率较低,仅为 3.34%,不同 SSR 类型所占比例随着核苷酸个数增加呈递减的趋势(表 2)。在单碱基 SSR 中,A 类型组成的 SSR 数量最多,为 25 532 个;C 类型组成的 SSR 数量最少,仅为 572 个。在二碱基 SSR 中,TG/AC 所占比例最高,为 42.43%,其次为 GT/

CA,GC/CG 所占比例最少,为 0.05%(图 1)。三碱基 SSR 中,以 GAG/AAC、AAT/CAG、ATT/CCT 3 种为主,分别占三碱基 SSR 总数的 9.61%、7.55% 和 7.08%(图 2)。出现频率最低的是五、六核苷酸 SSR,所占比例仅为 0.48% 和 0.10%。

**2.3 银鲟转录组 SSR 多态性评价** 统计 SSR 长度分布并进行分析,结果显示,银鲟转录组的 SSR 片段长度大部分分布在 10~449 bp,其中,12~<20 bp 含有数量最多的 SSR 片段,共有 48 820 个,占总 SSR 个数的 45.06%; $\geq 20$  bp 的 SSR 有 34 125 个,占 31.89%;<12 bp 的 SSR 数量最少,为 24 662 个,占 23.05%(图 3)。按照不同长度将 SSR 分为 2 类:具有高度的多态性(I型),其 SSR 长度 $\geq 20$  bp;多态性中等(II型),其 SSR 长度 12~<20 bp;而<12 bp 的 SSR 多态性较低,但其突变潜力较高。根据该结果,可推测该研究中 31.89% 的 SSR 为 I 型 SSR,多态性高;II 型 SSR 的比例为 45.06%,具有中等多态性;以上 2 种类型的 SSR 具有较高的潜在可用性。

表2 银鲟 SSR 不同基序长度和重复次数的分布规律

Table 2 Distribution regularities of different microsatellites motifs length and repeat count in *P. argenteus*

SSR 类型 SSR type	重复 5 次 5 repetitions	重复 6 ~ 10 次 6 - 10 repetitions	重复 11 ~ 15 次 11 - 15 repetitions	重复 16 ~ 20 次 16 - 20 repetitions	重复 21 ~ 25 次 21 - 25 repetitions	重复大 于 25 次 More than 25 repetitions	合计 Total	出现频率 Occurrence frequency %	所占比例 Proportion %
单碱基 Nucleotides	0	16 359	22 345	6 379	4 000	2 427	51 510	52.95	48.14
二碱基 Dinucleotides	0	20 608	9 349	3 549	1 599	1 387	36 492	37.51	34.10
三碱基 Trinucleotides	6 927	8 112	571	72	36	34	15 752	16.19	14.72
四碱基 Tetranucleotides	1 217	1 259	139	38	18	13	2 684	2.76	2.51
五碱基 Pentanucleotides	235	140	57	16	5	16	469	0.48	0.44
六碱基 Hexanucleotides	15	61	12	6	4	2	100	0.10	0.09
合计 Total	8 394	46 539	32 473	10 060	5 662	3 879	107 007	109.99	100.00
所占比例 Proportion//%	7.84	43.49	30.35	9.41	5.29	3.62	100.00		

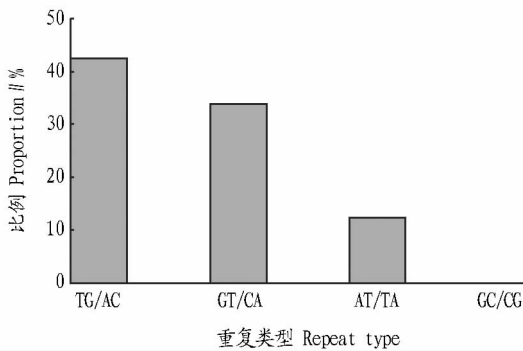


图1 银鲟转录组 SSR 二碱基基元重复类型分布

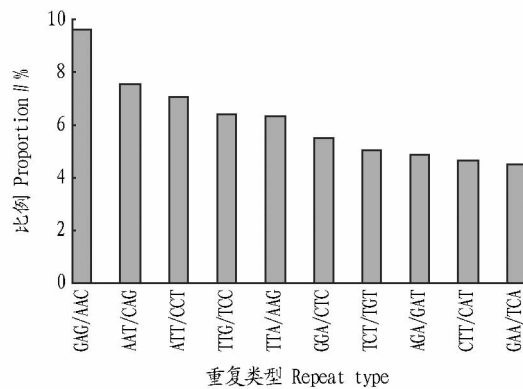
Fig. 1 Distribution of dinucleotide motifs repeat SSR identified by transcriptomic sequencing in *P. argenteus*

图2 银鲟转录组 SSR 三碱基基元重复类型分布

Fig. 2 Distribution of trinucleotide motifs repeat SSR identified by transcriptomic sequencing in *P. argenteus*

### 3 结论与讨论

近年来通过转录组数据的研究得到含有微卫星的序列,并对其遗传学研究已有很多报道<sup>[17-18]</sup>。采用转录组高通量测序,研究者从牙鲈转录组测序所得序列中成功筛选得到了42 183个SSR标记<sup>[10]</sup>;Fu等<sup>[19]</sup>从鲢鱼转录组测序结果中鉴定出13 327个SSR标记;Liao等<sup>[20]</sup>从鲫鱼转录组拼接所得序列中得到11 295个SSR标记。由此可知,该研究途径已在鱼类SSR标记位点的大规模筛选中成功应用。该研究通过Illumina高通量测序平台对银鲟肝组织转录组测序,从大量组装所得序列中筛选获得SSR位点。相对于传统微卫星标

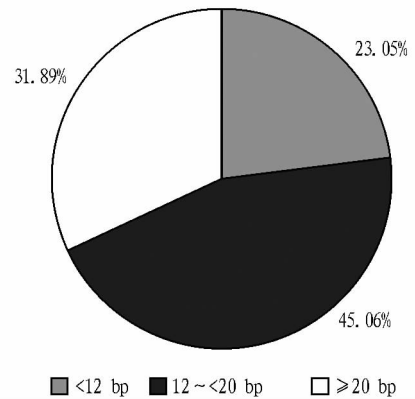


图3 银鲟转录组 SSR 长度分布

Fig. 3 Length distribution of transcriptomic SSR in *P. argenteus*

记的筛选方式,此方式筛选效率较高,工作量相对较小,适合大范围开拓SSR标记位点。基因的功能可能与这些被发现的位点有关,以此为后续遗传图谱构建、QTL定位等奠定基础。

该研究发现,在3 715 603个拼接所得的unigene序列中筛选得到107 007个微卫星标记。从得到的微卫星数量上看,其数目远大于其他物种转录得到的SSR数量,分析发现,序列拼接的长度及测序的数据量是其主要原因,李超等<sup>[10]</sup>在对牙鲈SSR标记信息的分析中,对牙鲈和团头鲂转录组测序获得的微卫星标记数目上的较大差异进行了分析。该研究获得的测序数据量大,它是将5个测序样本混合拼接,拼接得到的unigene数量庞大,因此鉴定出来的SSR标记数量较多,其覆盖度也更广。

该研究发现,银鲟所有鉴定出的微卫星标记中,单核苷酸重复微卫星数目所占比例最高,为48.14%;其次为二核苷酸,所占比例为34.10%,其中TG/AC占主要比例,占该重复类型总数的42.43%。李德等<sup>[21]</sup>对草鱼的研究发现,其二核苷酸重复类型数量最多,且AC/GT所占比例为50.3%;Wang等<sup>[22]</sup>对草鱼新型EST-SSR分子标记的开发研究发现,AC/GT的数目最多,为60.19%;宋春妮等<sup>[23]</sup>对日本鳊(*Charybdis japonica*)的研究发现二碱基AC重复类型在基因组中的含量非常高。上述结果与该研究结果有所差异,银鲟二碱基不是占有比例最高的,单碱基重复类型处于优势地位,但在二碱基重复类型的分布中,AC重复类型在各物种中

含量极其丰富,这种相似性的原因有待于进一步研究。各物种的重复基元存在种属特异性,该研究结果显示,银鲳中 CG 类型仅为 5 个。研究表明,在牙鲆<sup>[10]</sup>中 CG 仅占总 SSR 的 0.06%,斑海豹<sup>[24]</sup>为 0.2%,在日本沼虾<sup>[25]</sup>中未发现,而在桃树<sup>[26]</sup>、大豆<sup>[27]</sup>等植物中未发现 CG 重复基元。该情况产生的原因与生物进化是否相关,有待于后续进一步研究。在该研究中,重复类型所占比例居于第三位的是三碱基重复类型,占 SSR 总数的 14.72%,其中以 GAG/AAC、AAT/CAG、AAT/CCT 3 种为主,这与徐鹏等<sup>[13]</sup>和 Jin 等<sup>[25]</sup>的研究结果不同,可能是由于研究的组织差异及鉴定的微卫星总数目差异引起的,该研究基于转录组测序得到的微卫星数目多,且是基于公共数据库获得的,从零星 EST 库中筛选的 SSR 序列数量不足以支撑整个基因组,其 SSR 分布情况较片面。

SSR 在整个基因组的不同位点都有分布,多态性是分析分子标记性能优劣的重要依据,SSR 片段长度又是判断其多态性的重要依据<sup>[28]</sup>。从转录组数据筛选得到的 SSR 中,重复序列长度在 12 bp 以上的 SSR 标记位点数占总 SSR 数的 76.95%,多态性较丰富,基于该研究结果能够进行有针对性的引物设计。在 QTL 定位研究及遗传连锁图谱的构建中,SSR 多态性越高,所建立的图谱越精密精确,基因的定位越精准<sup>[29]</sup>。

对于银鲳种质资源衰退、遗传性状单一及种群受环境影响较大等诸多尚未解决的问题,可以通过微卫星标记找出其是否为遗传学方面的原因。基于 SSR 标记,利用微卫星引物对银鲳不同群体进行扩增,筛选扩增出的稳定条带进行分析。由于微卫星具有高度多态性的特性,且遵循孟德尔遗传规律,可以通过观察不同个体位点扩增情况,进一步判断遗传情况。

该研究基于银鲳转录组的高通量测序信息,初次筛选获得大量的 SSR 标记,对银鲳 SSR 的分布特征进行分析,不仅在 RNA 水平上体现了银鲳 SSR 的分布特点和规律,而且也为开发银鲳功能基因奠定 SSR 分子标记基础,同时也为银鲳 QTL 定位、基因克隆、遗传结构分析及其他遗传学研究提供有效的分子标记。

## 参考文献

- [1] 赵莹莹,朱晓琛,孙效文,等. 虾夷扇贝的多态性微卫星座位[J]. 动物学报,2006,52(1):229-233.
- [2] SONG W T,LI Y Z,ZHAO Y W,et al. Construction of a high density microsatellite genetic linkage map and mapping of sexual and growth-related traits in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Plos One, 2012,7(11):1-13.
- [3] 柳明,喻达辉,黄桂菊,等. 中国海南三亚大珠母贝不同年代种群的遗传变异研究[J]. 南方水产科学,2011,7(1):26-31.
- [4] PEREZ E R,TAKAGI M,TANIGUCHI N. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers [J]. Aquaculture,1999,173(1):413-423.
- [5] OZAKI A,YOSHIDA K,FUJI K,et al. Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to a monogenean parasite (*Benedenia seriolae*) in yel-

- lowtail (*Seriola quinqueradiata*) through genome wide analysis [J]. PLoS One,2013,8(6):1-14.
- [6] 孙成飞,叶星,董浚健,等. 罗氏沼虾 6 个养殖群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 南方水产科学,2015,11(2):20-26.
- [7] 魏继海,赵金良,吴俊伟,等. 尼罗罗非鱼(♀) × 萨罗罗非鱼(♂) 杂交 F2 与 F3 群体遗传特征的微卫星分析[J]. 南方水产科学,2016,12(1):30-35.
- [8] TSAI C S,SHIH H C,WANG H V,et al. RNA-Seq SSRs of moth orchid and screening for molecular markers across genus *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*) [J]. PLoS One,2013,10(11):1-18.
- [9] BOSAMIA T C,MISHRA G P,THANKAPPAN R A,et al. Novel and stress relevant EST derived SSR markers developed and validated in *Peanut* [J]. PLoS One,2015,10(6):1-19.
- [10] 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.
- [11] 杨兵,林琳,李纯厚,等. 基于高通量测序的二长棘鲷微卫星标记开发与评价[J]. 南方水产科学,2015,11(4):116-120.
- [12] 岳华梅,翟晴,宋明月,等. 基于转录组测序的兴国红鲤微卫星标记筛选[J]. 淡水渔业,2016,46(1):24-28.
- [13] 徐鹏,周令华,田丽萍,等. 从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究[J]. 水产学报,2003,27(3):213-218.
- [14] 施兆鸿,马凌波,高露霞,等. 人工育苗条件下银鲳仔稚幼鱼摄食与生长特性[J]. 海洋水产研究,2007,28(4):38-46.
- [15] 施兆鸿,彭士明,王建钢,等. 人工养殖银鲳子代胚胎发育及仔稚幼鱼形态观察[J]. 中国水产科学,2011,18(2):267-274.
- [16] 彭士明,施兆鸿,高权新,等. 增加饲料中 V<sub>C</sub> 质量分数对银鲳血清溶菌酶活性及组织抗氧化能力的影响[J]. 南方水产科学,2013,9(4):16-21.
- [17] TIAN C X,GLIAN X F,YANG M,et al. New microsatellite loci for the mandarin fish *Siniperca chuatsi* and their application in population genetic analysis [J]. Genet Mol Res,2014,13(1):546-558.
- [18] XIAO T Q,LU C Y,XU Y L,et al. Screening of SSR markers associated with scale cover pattern and mapped to a genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. J Appl Genet,2015,56(2):261-269.
- [19] FU B D,HE S P. Transcriptome analysis of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by paired-end RNA sequencing [J]. DNA Res,2012,19(2):131-142.
- [20] LIAO X L,CHENG L,XU P,et al. Transcriptome analysis of crucian carp (*Carassius auratus*), an important aquaculture and hypoxia-tolerant species [J]. PLoS One,2013,8(4):1-11.
- [21] 李德,刘航,黄容,等. 草鱼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.
- [22] 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.
- [23] 宋春妮,李健,刘萍,等. 日本鳎微卫星富集文库的建立与多态性标记的筛选[J]. 水产学报,2011,35(1):35-42.
- [24] GAO X,HAN J,LU Z,et al. De novo assembly and characterization of spotted seal *Phoca largha* transcriptome using Illumina paired-end sequencing [J]. Comp Bio & Phy:Part D,2013,8(2):103-110.
- [25] JIN S,FU H,ZHOU Q,et al. Transcriptome analysis of androgenic gland for discovery of novel genes from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, using Illumina HiSeq 2000 [J]. PLoS One,2013,8(10):1-13.
- [26] JUNG S,ABBOTT A,JESUDURAI C,et al. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in *Rosaceae* ESTs [J]. Fun & Intege Gen,2005,5(3):136-143.
- [27] GAO L,TANG J,LI H,et al. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches [J]. Molr Bre, 2003,12(3):245-261.
- [28] 孙蛟龙,方扬,靳艳玲,等. 浮萍转录组数据 SSR 位点的生物信息学分析[J]. 应用与环境生物学报,2015,21(3):401-405.
- [29] PINTO L R,OLIVEIRA K M,MARCONI T,et al. Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs [J]. Pla Bre,2006,125(4):378-384.