

从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物

陈军方^{1,2} 任正隆² 高丽锋¹ 贾继增^{1,*}

(¹ 中国农业科学院作物品种资源研究所,农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室,北京 100081; ² 四川农业大学农学院遗传育种系,四川雅安 625014)

摘要: 小麦 EST 数量的迅速增加为开发新的 SSR 标记提供了宝贵的数据资源,本实验从国际小麦族 EST 协作网 (ITEC) 上公布的 10 380 条 EST 序列中检索到 444 条含有 SSR 的序列,检出率为 4.1%。其中含二核苷酸重复单元和三核苷酸重复单元的 SSR-ESTs 分别为 34 条 (7.7%) 和 347 条 (78.0%)。利用这些 SSR-ESTs 序列共设计 135 对 cSSR 引物,其中 82 对在小麦上有扩增产物,占所设计引物总数的 60.8%。利用小麦缺体-四体,32 对 cSSR 引物被定位到小麦除 2D、4B 和 4D 外的 18 条染色体上。

关键词: EST; SSR-ESTs; cSSR 引物; 小麦
中图分类号: S512.078

Developing New SSR Markers from EST of Wheat

CHEN Jun-Fang^{1,2}, REN Zheng-Long², GAO Li-Feng¹, JIA Ji-Zeng^{1,*}

(¹ Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ² Department of Plant Breeding and Genetics, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

Abstract: The growing availability of EST sequences from wheat provides a potential valuable source of new SSR markers. In this study, 444 SSR-ESTs from 10 380 ESTs in the International Triticeae EST Cooperative (ITEC) database, representing 4.1% of the total number of ESTs were identified. Among them, 34 dinucleotide repeats and 347 trinucleotide repeats were found, accounting for 7.7% and 78.0% of the total SSR-ESTs respectively. 135 cSSR primers were designed to sequence flanking SSRs from 175 selected SSR-ESTs, of which 82 primers were efficient in wheat. 32 of the 82 cSSR primers were located on 18 wheat chromosomes except for 2D, 4B and 4D of 21 wheat chromosomes.

Key words: EST; SSR-ESTs; cSSR primers; Wheat

SSRs (simple sequence repeats) 即简单重复序列, 又称微卫星 DNA (Microsatellites), 是一种由 2~5 个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列, 现已证明存在于绝大多数真核生物基因组中。与其他分子标记相比, SSR 标记数量丰富, 等位基因变异多, 信息含量高, 表现为共显性遗传, 可利用 PCR 进行分析, DNA 用量少, 操作简便, 重复性好, 因此 20 世纪 90 年代以来已经被遗传学家广泛用作分子标记。

目前, SSR 标记已经在小麦基因组作图、小麦种质资源遗传多样性分析、构建小麦指纹图谱、小麦品种鉴定和基因诊断等研究领域展示出较大的应用潜

力。但随着小麦基因组研究的进一步深入, 现有的 SSR 标记已不能满足小麦高密度遗传图谱构建等研究的需要, 成为小麦遗传作图、基因克隆等研究的限制因素, 因此开发应用新的 SSR 标记势在必行。

ESTs (expressed sequence tags) 是指从不同组织来源的 cDNA 文库中随机挑选克隆进行 5' 或 3' 端测序后得到的长约 300~400 bp 的基因表达序列片段。随着国际麦类 EST 计划的不断实施, 截至目前, 小麦中开发、登记的 EST 已由 2000 年 6 月的 7 条增加到了 2003 年 5 月 9 日的 415 747 条。研究表明, 7%~10% 的 EST 序列中存在简单重复序列, 这为从 EST 序列中开发利用新的 SSR 标记奠定了分

基金项目: 国家 863 项目“小麦新型分子标记开发及抗病、优质、高产新品种培育”(2001AA211031)。

作者简介: 陈军方 (1975-), 女, 山东省冠县人, 作物遗传育种专业博士。* 通讯作者: 贾继增, 男, 博导, 中国农业科学院研究员。E-mail: jzjia@mail.caas.net.cn

Received (收稿日期): 2003-11-11, Accepted (接受日期): 2004-04-10.

子基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为普通小麦品种中国春和以中国春为回交亲本,连续回交 12 代的中国春矮败小麦。EST-SSR 标记定位材料为中国春的 21 个小麦缺体-四体系列。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用常规的酚/氯仿法,纯化后用 1 × TE 溶解,4 °C 保存备用。

1.2.2 含 SSR 小麦 EST 序列的检索 EST 序列来源为本实验室共享的国际小麦族 EST 协作网 (International Triticeae EST Cooperative, ITEC) 上已公布的 40 320 条 EST 序列,随机选取其中 10 380 条。利用 SSRIT (<http://arsgenome.cornell.edu/cgi-bin/rice/ssrtool.pl>) 软件,搜索含有 SSRs 的 EST 序列。利用 RepeatMasker Program (Mit, 1999; <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>) 去除其他重复序列和载体序列;用 StackPACK (Miller *et al.*, 1999; <http://www.egenetics.com>) 对 SSR-ESTs 进行分类并去除重复的 SSR-ESTs。

1.2.3 SSR 引物设计 利用 DNASTAR 软件包中的 Editseq 和 Primerselect 软件设计 SSR 引物。引物设计选定的条件如下:引物长度范围为 19~21 bp;引物退火温度在 50~65 °C 之间,上下引物之间退火温度相差不超过 5 °C;扩增片段长度在 150~350 bp 之间,最长不超过 500 bp。

1.2.4 SSR 扩增反应 反应液 25 μL,其中含 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL,25 mmol/L dNTP 0.2 μL,2 μmol/L SSR 引物 3.2 μL, *Taq* 聚合酶 1 U,模板 DNA 30~50 ng,加水补充至 25 μL,扩增反应在 PTC-225 PCR 扩增仪上进行。扩增反应程序:94 °C 预变性 4 min,94 °C 1 min,适宜 *T_m* 为 1 min,72 °C 1 min,循环 31~35 次,72 °C 延伸 5 min,反应终止在 4 °C。

1.2.5 凝胶电泳及银染 SSR 扩增反应液在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,100 W,1 h,银染方法参照 Sourdille^[1]。

2 结果与分析

2.1 SSR-ESTs 检索分析

截至 2001 年 5 月 4 日,国际麦类 EST 协作网 (ITEC) 上共公布 EST 序列 60 022 条。本研究从 10 380

条中,利用 SSRIT 软件,共检索出 444 条含有 SSR 的 EST 序列,即 SSR-ESTs 占有 EST 总数的 4.1%。检索时所设定的条件为重复序列不少于 18~20 核苷酸,即二核苷酸重复至少 10 次,三核苷酸至少重复 6 次以上,四核苷酸重复 5 次,五核苷酸至少重复 4 次,六核苷酸至少重复 3 次以上。之所以选用这个标准是因为 Cho 等^[2]的研究发现,在水稻中小于 18 核苷酸 SSR 的多态性显著降低。在所检出的含有 SSR 的 EST 序列中,含二核苷酸重复单元的有 34 条,占所检出总数的 7.7%;含三核苷酸重复单元的有 347 条,占所检出总数的 78.0% (见表 1)。

在 34 条含有二核苷酸重复单元的 SSR-ESTs 中,含 AG/TC 重复单元的数量最多,有 18 条,占 53.0%,而没有一条含 CC/CG 重复单元。本研究中共检索到 347 条含三核苷酸重复单元的 SSR-ESTs,其中 AAC/TTG 重复单元出现频率最高,为 95 条,占 27.6%;其次为含 GCC/CCG 重复单元的 SSR-ESTs,为 91 条,占总数的 26.0%。这两类重复类型占了三核苷酸重复类型总量的半数以上,而其他重复类型则相对较少 (表 2)。

表 1 SSR-ESTs 序列中不同重复核苷酸数的数量及百分比

重复核苷酸数 Number of repeats	SSR-ESTs 数量 (条) Number of SSR-ESTs	占有所有 SSR-ESTs 的百分比 % of SSR-ESTs with SSRs
二核苷酸 Dinucleotide	34	7.7
三核苷酸 Trinucleotide	347	78.0
四核苷酸 Tetranucleotide	14	3.2
五核苷酸 Pentanucleotide	22	5.0
六核苷酸 Hexanucleotide	27	6.1
SSR-ESTs 总数	444	

表 2 SSR-ESTs 序列中不同重复类型及其数量和百分比

重复单元数 Number of repeats	重复单元 SSR motif	EST 数量 (条) Number of EST	百分比 Percentage (%)
二核苷酸 Dinucleotide	AC/TG	9	26.5
	AG/TC	18	53.0
	AT/TA	7	20.5
	CC/CG	0	0
三核苷酸 Trinucleotide	AAC/TTG	95	27.6
	GCC/CCG	91	26.0
	ACC/TCG	79	22.7
	ACG/TCC	39	11.2
	ACC/TGG	23	6.6
	AGG/TCC	12	3.5
	CIA/GAT	8	2.4

2.2 EST-SSR (cSSR) 引物设计及筛选结果

利用 DNASTAR 软件包中的 EditSeq 和 PrimerSelect 软件,选取 175 条 SSR-ESTs 序列,设计 cSSR 引物 135

对,以中国春矮败小麦可育和不育 DNA 为模板进行扩增、筛选,聚丙烯酰胺凝胶电泳显示其中 82 对引物在中国春矮败小麦 DNA 上有清晰的扩增条带,占所设计 cSSR 引物总数的 60.8%,但在可育和不育小麦间未发现表现有差异的 cSSR 引物。

对在中国春矮败小麦上有扩增的 82 对 cSSR 引

物,用 21 个中国春小麦缺体-四体系进行染色体定位,结果共有 32 对 cSSR 引物被定位到小麦的特定染色体上(见图 1)。32 个已定位的 cSSR 引物情况及其在小麦染色体上的分布见表 3。

由表 3 可见,已定位的 32 个 cSSR 引物均匀、随机地分布在除 2D、4B 和 4D 外的其他 18 条小麦染色体上。

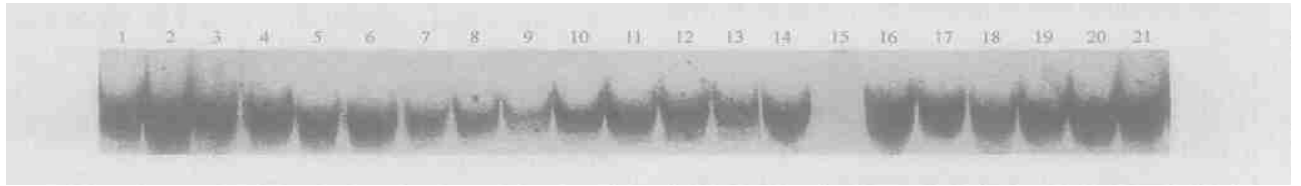


图 1 来源于 BE517115 的 cSSR 引物被定位到小麦 5D 染色体上

Fig. 1 The cSSR primer based on BE517115 was located on chromosome 5D

1-N1AT1B; 2-N1BT1A; 3-N1DT1A; 4-N2AT2B; 5-N2BT2A; 6-N2DT2A; 7-N3AT3B; 8-N3BT3D; 9-N3DT3A; 10-N4AT4B; 11-N4BT4A; 12-N4DT4A; 13-N5AT5B; 14-N5BT5A; 15-N5DT5A; 16-N6AT6B; 17-N6BT6A; 18-N6DT6A; 19-N7AT7B; 20-N7BT7A; 21-N7DT7A.

表 3 32 个已定位的 cSSR 引物情况及其在小麦染色体上的分布

Table 3 Information of 32 located cSSR primers and its distribution on wheat chromosomes

EST 序列 EST sequence	重复单元 Repeat	退火温度 T_m (°C)	扩增片断长度 Product size (bp)	染色体定位 Chrom. location	引物上链 Forward primer (5' - 3')	引物下链 Reverse primer (5' - 3')
BE399089	(AAC) ₁₁	50	191	5A	ATGCATGGATGTTGTAATTG	GTTGTTGTTTGTGTTGAT
BE424205	(AAC) ₈	50	159	2B	CATCTCA GCAAAACCCACAG	GA GAA GA GAA GAA GCCAACT
BE399860	(AAC) ₈	50	160	1B	CGCA GCCGCAACTACCATA	A GGATTTGTTGTTCTTGTTG
BE425125	(AAC) ₇	55	452	7B	TTCACA GCAACAACAAATAC	TGGAA GICATCACCTCAAG
BE606294	(AAC) ₁₄	55	375	1A	TTTCTCATCCTTGCCCTCCTT	TTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
BE606386	(AC) ₁₁	60	173	6A	GCTAATGCCGCTGCCTCGIT	CTCACCCGCTCACCTCGTC
BE515708	(AC) ₁₆	50	191	5D	CTACATAATAACACAAAACA	GTGACGGCGGATAATAAGGT
BE470813	(TA) ₁₁	50	242	3D	CATCCGTGGACTGCTCT	CAAACCGTGATACAAAATAG
BE399069	(TA) ₁₅	50	208	3B	ACACATGCCAACCA GACA	GGAA GCCCAACAAAACC
BE497991	(GA) ₁₄	60	213	7B	TGCTCTACACGGGGAACAC	TGGAGCCAATGATGATGC
BE473227	(AgC) ₆	60	209	6B	CAGCCGCAACCA TTTTCAT	A GCTGCTGACAACACAAT
BE424312	(AgC) ₆	60	226	6A	ATGCATGGATGTTGTAATTG	GA GGCTGTGGAA GGA GA
BF293493	(AgC) ₇	55	197	6A	ATGCATGGATGTTGTAATTG	GTTGTTGTTGTTGTTTGTGTT
BE637039	(AgC) ₆	60	151	7D, 3A	TA GCCGATCTCCTCTCCTTCC	A TCTTCCCCGCCCACTCTCC
BE489854	(AgC) ₆	60	107	1D	A GATCA GCCTGCTGTTCTTTC	CTGGTCTCCTCCGCTCTGCT
BE517914	(TCCCc) ₃	50	177	6D	CCTGTTCTACGATACG	A GGA GGA GCTTGATGA G
BE586613	(TgTgCg) ₃	50	216	6D	GCAATGGCTTCA GTTCA	GGTAA GGGCGGGGGA GGTG
BE497844	(CCg) ₆	50	140	1B	A GAA GCCGCA GGGGA GAG	TGC CCA GGTA GGTGGTGA
BE637905	(CCg) ₇	55	242	3D	CGA GGA GGA GGA GGA GAGG	TGGTACTTGACGGGGAACG
BE517115	(CCg) ₁₀	50	204	5D	AATTAACCCCGGACA GAGC	CA GCCTGGTGGCGGTGAC
BE406339	(CCg) ₇	55	117	2A	CTCGCTCGTCCCAAATCT	TCCTTGCCATA GTTCACCA
BE517017	(ATAC) ₅	55	237	4A	TCCCTCCCTCCCTCGTCTA	AACCTTCCATACACTCTCTT
BE404098	(TTTC) ₆	50	280	2A	A GCAA GCAACAA GGA GCAACA	AA GAA GA GAA GAACACCA GAAA
BF293342	(AACCC) ₅	50	225	4A	GCTA GATGCAA GAAA GAG	CCAAGCA GCGGAATCAAT
BE398522	(AATCC) ₄	50	181	7A	AAA GCCACC GGA GATGAA	GTGCGCTGGACGAACTT
BE794904	(AgCTg) ₄	50	171	5A, 5B	TCCC GAGAA GAA GCGAGAT	CCCCA GCA GCA GCACCGTCAC
BE498979	(ATCCC) ₄	55	145	6A	CCGGCCCCGATTTGTT	CACGGCCCGGAA GAA GC
BE405558	(TCCCC) ₄	60	136	7D	CCTGTTCTACGATACG	A GGA GGA GCTTGATGA G
BE492979	(AACTgg) ₄	55	121	2A, 2B	ATTCTGTTGCCCCCTTCA	GTCGCTA GCTACTCCACT
BE606535	(CCggCg) ₃	55	206	7D	ATTTCGCCGCTCTCTCT	CGAATTGGCCCTTGACG
BE404492	(CCg) ₉	55	134	5B, 5D	CACCTCCTCCCTCTCTG	CCGTCGACGTTGGTGTG

3 讨论

3.1 EST 的飞速发展作为开发新的 SSR 引物提供了宝贵资源

由于一段短的 EST 序列就可以反映出基因的性质,因此 EST 技术是发现新基因的好方法,逐渐引起了世界各著名实验室的重视,并相继开展了不同物种的 EST 计划。目前公共数据库中的 EST 数目迅速增加 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbESTsummary.html>),由 1991 年的不足 2 000 条,增加到 2003 年 5 月的 16 626 752 条。在最大的公共数据库 GenBank 中,截至 2003 年 5 月 9 日,人的 EST 数为 5 142 390 条,占 EST 总数的 30% 强。排名第六的小麦是 EST 数目最多的植物,为 415 747 条,比玉米 (210 748)、水稻 (201 747) 等禾本科作物多一倍。

EST 数量的飞速增加为开发利用新的 SSR 引物提供了宝贵的数据资源。目前全世界已有多家实验室正致力于从 EST 中开发 SSR 和 SNP 引物,并取得了可喜成绩^[2-6]。

3.2 EST 中简单重复序列 (SSR) 的分布特点

SSRs 在整个真核生物基因组的的不同座位上广泛分布,研究发现,SSRs 不仅分布于基因间隔区,而且也广泛分布于基因编码区。对大麦、玉米、燕麦、和小麦等禾谷类作物 ESTs 中 SSR 的含量、出现频率、重复类型等的研究表明,7% ~ 10% 的 EST 序列含有 SSR,其中 3% 可用于 EST-SSR 引物设计。SSR 在大麦、玉米、小麦、燕麦、黑麦、高粱和水稻中出现的频率分别为 7.5 kb、7.5 kb、6.2 kb、5.5 kb、5.5 kb 和 3.9 kb,平均 6.0 kb 出现一个 SSR。其中三核苷酸重复出现次数最多 (54% ~ 78%),其次为二核苷酸重复类型 (17% ~ 40%),而四核苷酸以上重复类型较少^[7]。

研究发现,在二核苷酸重复 SSR-ESTs 中,含 AG/TC 重复单元的最多,而含 GC/CG 重复单元的数量最少^[5],本实验的结果也证明了这一点。出现这种情况可能的原因之一是二核苷酸重复单元 AG/TC 在 mRNA 中根据不同的阅读起始位点可以分别读为:GAG、AGA、UCU 和 CUC,从而分别翻译为 Arg、Gu、Ala 和 Leu 氨基酸,而 Ala 和 Leu 氨基酸在蛋白质中出现的频率分别高达 8% 和 10%^[8]。

Ramesh 等分析了大麦、玉米、高粱以及水稻 4 种禾本科作物 EST 序列中 SSR 的分布规律,发现含三核苷酸重复单元的 SSR-ESTs 中 GGC/CCG 重复单

元出现频率最高,而在小麦中,出现频率最高的是 AAC/TTG 重复^[5]。本实验中,在 347 条含三核苷酸重复单元的 SSR-ESTs 中,AAC/TTG 重复单元出现频率最高,为 95 条,占有三核苷酸重复类型总数的 27.6%;其次含 GGC/CCG 重复单元的为 91 条,占总数的 26.0%。这两类重复类型占了三核苷酸重复类型总量的半数以上,而其他重复类型则相对较少。

3.3 EST-SSRs 引物的优点及发展前景

Eujayl 等^[3]通过对不同来源的 SSR 比较,发现 EST-SSR 扩增较好,但是其多态性较低 (25%),而来自基因组的 SSR 的多态性较高 (53%)。尽管 EST-SSR 多态性低,但与传统 SSR 引物相比,其引物在以下几方面具有明显优点:

3.3.1 EST-SSRs 含量丰富,可通过电子搜索快速获得,无需建库、测序,因此开发成本低、效率高。SSR 的传统获得途径是分离植物基因组。这种方法需要经过基因文库构建、筛选、大规模测序等阶段,开发成本较大,限制了 SSR 标记的大量开发。而 EST-SSR 引物开发则省去了这些步骤,可以在庞大的 EST 数据库中利用计算机软件直接搜索含有 SSR 的 EST,利用 SSR 两端的保守序列设计引物,缩短了开发周期,节省了开发成本。

3.3.2 EST-SSRs 作为基因的一部分,信息含量高,可直接用于基因作图。作为一种新型的 SSR 标记,EST-SSRs 标记来源于基因本身,因此是一种有功能的分子标记。EST-SSRs 的开发使无功能分子标记向可揭示基因转录功能的分子标记转化。Sylvia 等认为小麦 EST-SSRs 为小麦转录遗传图提供了技术路线,便于已知功能基因的定位^[9]。

3.3.3 EST-SSRs 在物种间通用性好,可用于比较基因组研究。比较基因组研究主要是利用相同的分子标记 (主要是 cDNA 标记和基因克隆) 在相关植物种之间进行遗传或物理作图。比较作图要求图谱上的标记必须能够找出几个物种的同源位点,并且在种内有一定的多态性。EST-SSRs 引物来源于 SSR 两端相对保守的序列,在物种间有较好的通用性,这使得 EST-SSRs 引物在比较作图方面有很大的应用潜力^[4,6]。

3.3.4 EST-SSRs 可用于物种的起源进化研究。对某一物种基因组微卫星序列分布和变异的研究,可以阐明该物种起源、进化分支点和人工选择的历史过程。人类和果蝇的群体与进化研究表明,多态性微卫星标记有助于了解群体分化和选择瓶

颈^[10,11]。另一方面,突变率低的较稳定的 SSR 标记(如 EST-SSRs)可被用于重建较为久远的进化事件^[12,13]。

作为一种新型的 SSR 标记,与普通 SSR 标记相比,EST-SSR 标记即基因的一部分具有更大的应用价值。随着小麦中 EST 数量的不断增加,从 EST 序列中开发 EST-SSRs 标记将会成为 SSR 标记的主要来源。而这些新开发的 EST-SSRs 标记将会被逐渐绘制到遗传图谱中,势必对小麦的分子标记辅助育种、基因定位及克隆产生重大影响。

References

- [1] Sourdille P, Charmet G, Trottet M, Tixier M H, Boeuf C, Nègre S, Barloy D, Bernard M. Linkage between RFLP molecular markers and the dwarfing genes *Rht-B1* and *Rht-D1* in wheat. *Hereditas*, 1998, **128**:41 - 46
- [2] Cho Y G, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, Park W D, Ayres N, Cartinhour S, McCouch S R. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2000, **100**:713 - 722
- [3] Eujayl I, Sorrells M E, Baum M, Wolters P, Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, **104**:399 - 407
- [4] Holton R A, Christopher J T, McClure L, Harker N, Henry R J. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding*, 2002, **9**: 63 - 71
- [5] Kantety R V, Rota M L, Matthews D E, Sorrells M E. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol Bio*, 2002, **48**: 501 - 510
- [6] Thiel T, Michalek W, Varshney R K, Graner A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet*, 2003, **106**:411 - 422
- [7] Varshney R K, Thiel T, Stein N, Langridge P, Graner A. *In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, **7**: 537 - 546
- [8] Lewin B. *Genes*. Oxford University Press, New York. 1994
- [9] Sylvia Stack, Campbell L, Henderson K, Eujayl I, Hanafey M, Powell W, Wolters P. Development of EST-derived microsatellite markers for mapping and germplasm analysis in wheat. *Plant & Animal Genome Conference*, San Diego, CA, 2000, January 9 - 12
- [10] Di Rienzo A, Peterson A C, Garza J C, Valdes A M, Slatkin M, Freimer N B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**:3 166 - 3 170
- [11] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**:457 - 462
- [12] Meyer E, Wiegand P, Rand S P, Kuhlmann D, Brack M, Brinkmann B. Microsatellite polymorphisms reveal phylogenetic relationships in primates. *J Mol Evol*, 1995, **41**:10 - 14
- [13] Rossetto M, McNally J, Henry R J. Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining relationships in Vitaceae. *Theor Appl Genet*, 2002, **104**: 61 - 66