

## 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物

陈军方<sup>1,2</sup> 任正隆<sup>2</sup> 高丽锋<sup>1</sup> 贾继增<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> 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; <sup>2</sup> 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<sup>1,2</sup>, REN Zheng-Long<sup>2</sup>, GAO Li-Feng<sup>1</sup>, JIA Ji-Zeng<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Crop Germplasm & Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>2</sup> 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 MgCl<sub>2</sub> 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<sub>m</sub> 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<sup>[1]</sup>。

## 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<sup>[2]</sup>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
	CTA/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。

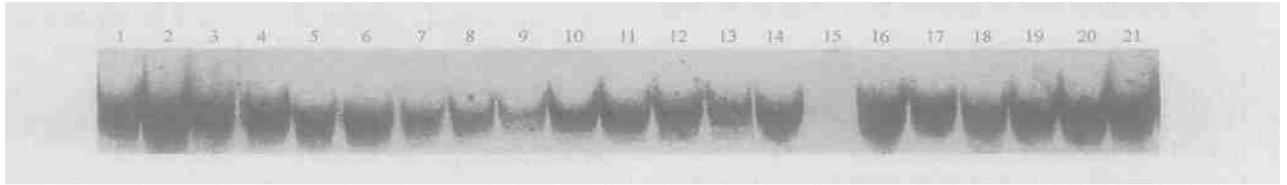


图 1 来源于 BE517115 的 cSSR 引物被定位到小麦 5D 染色体上

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) <sub>11</sub>	50	191	5A	ATGCATGGATGTTGTAATTG	GTTGTTGTTTTTGTGTGAT
BE424205	(AAC) <sub>8</sub>	50	159	2B	CATCTCA GCAAAACCCACAG	GA GAAGA GAAGA GCCAACT
BE399860	(AAC) <sub>8</sub>	50	160	1B	CGCA GCCGCAACTACCATA	AGGATTTGTGTTCCTTGTTG
BE425125	(AAC) <sub>7</sub>	55	452	7B	TTCACA GCAACAACAAATAC	TGGAA GICATCACCTCAAG
BE606294	(AAC) <sub>14</sub>	55	375	1A	TTTCTCATCCTTGCCCTCCTT	TTGTTGTTGTTGTGCTTGTG
BE606386	(AC) <sub>11</sub>	60	173	6A	GCTAATGCCGCTGCCTCGIT	CTCACCCGCTCACCTCGTC
BE515708	(AC) <sub>16</sub>	50	191	5D	CTACATAATAACACAAAACA	GTGACGGCGGATAATAAGGT
BE470813	(TA) <sub>11</sub>	50	242	3D	CATCCGTGGACTGCTCT	CAAACCGTGATACAAAATAG
BE399069	(TA) <sub>15</sub>	50	208	3B	ACACATGCCAACCA GACA	GGAA GCCCAACAAAACC
BE497991	(GA) <sub>14</sub>	60	213	7B	TGCTCTACACGGGGAACAC	TGGAGCAATGATGATGC
BE473227	(AgC) <sub>6</sub>	60	209	6B	CAGCCGCAACCA TTTTCAT	AGCTGCTGACAACACAAT
BE424312	(AgC) <sub>6</sub>	60	226	6A	ATGCATGGATGTTGTAATTG	GAGGCTGTGGAA GGA GA
BF293493	(AgC) <sub>7</sub>	55	197	6A	ATGCATGGATGTTGTAATTG	GTTGTTGTTGTTGTTTTGTT
BE637039	(AgC) <sub>6</sub>	60	151	7D,3A	TA GCCGATCTCCTCTCCTTCC	ATCTTCCCCGCCCACTCTCC
BE489854	(AgC) <sub>6</sub>	60	107	1D	A GATCA GCCTGCTTCCTTC	CTGGTCTCCCCGCTCTCT
BE517914	(TCCCC) <sub>3</sub>	50	177	6D	CCTGTTCCTACGATACG	AGGA GGA GCTTGTATGA G
BE586613	(TgTgCg) <sub>3</sub>	50	216	6D	GCAATGGCCTTCA GTTCA	GGTAA GGGCGGGGGA GGTG
BE497844	(CCg) <sub>6</sub>	50	140	1B	A GAA GCCGCA GGGGA GAG	TGC CCA GGTA GGTGGTGA
BE637905	(CCg) <sub>7</sub>	55	242	3D	CGA GGA GGA GGA GGA GAGG	TGGTACTTGACGGGGAACG
BE517115	(CCg) <sub>10</sub>	50	204	5D	AATTAACCCCGGACA GAGC	CA GCCTGGTGGCGGTGAC
BE406339	(CCg) <sub>7</sub>	55	117	2A	CTCGCTCGTCCCAAATCT	TCCTTGCCATA GTTCACCA
BE517017	(ATAC) <sub>5</sub>	55	237	4A	TCCCTCCCTCCCTC GTCTTA	AACCTTCCATACACTCTCT
BE404098	(TTTC) <sub>6</sub>	50	280	2A	A GCAA GCAACAA GGA GCAACA	AA GAAGA GAAGA CACCA GAAA
BF293342	(AACCC) <sub>5</sub>	50	225	4A	GCTA GATGCAA GAAA GAG	CCAAGCA GCGGAATCAAT
BE398522	(AATCC) <sub>4</sub>	50	181	7A	AAA GCCACC GGA GATGAA	GTGCGCTGGACGAACTT
BE794904	(AgCTg) <sub>4</sub>	50	171	5A,5B	TCCC GA GAA GAA GCGAGAT	CCCCA GCA GCA GCACCGTCAC
BE498979	(ATCCC) <sub>4</sub>	55	145	6A	CCGGCCCCGCA TTTGTT	CACGGCCCGGAA GAA GC
BE405558	(TCCCC) <sub>4</sub>	60	136	7D	CCTGTTCCTACGATACG	AGGA GGA GCTTGTATGA G
BE492979	(AACTgg) <sub>4</sub>	55	121	2A,2B	ATTCTGTTGCCCCCTTCA	GTCGCTA GCTACTCCACT
BE606535	(CCggCg) <sub>3</sub>	55	206	7D	ATTTCGCCGCTCTCTCT	CGAATTGGCCCTTGACG
BE404492	(CCg) <sub>9</sub>	55	134	5B,5D	CACCTCCTCCCTCTCTG	CCGTTCGACGTTGGTGT

### 3 讨论

#### 3.1 EST 的飞速发展开发新的 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<sup>[2-6]</sup>。

#### 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<sup>[7]</sup>。

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<sup>[5]</sup>,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%<sup>[8]</sup>。

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<sup>[5]</sup>。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<sup>[3]</sup>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<sup>[9]</sup>。

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<sup>[4,6]</sup>。

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<sup>[10,11]</sup>。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<sup>[12,13]</sup>。

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