浙江大学学报（农业与生命科学版） 38(6)：655~661，2012
Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)
http://www.journals.zju.edu.cn/agr
E-mail: zdxbnsb@zju.edu.cn **DOI**: 10.3785/j.issn.1008-9209.2012.01.221

烟草 MITE 位点间多态性 (IMP) 标记开发及其遗传作图应用

高玉龙[1]，桂毅杰[2]，肖炳光[1*]，薄世平[2]，严广号[2]，樊龙江[2]
（1.云南省烟草农业科学研究院，云南 玉溪 653100；2.浙江大学 农业与生物技术学院 农学系，浙江 杭州 310058）

摘要 为在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 上进行IMP (inter-MITE polymorphism, MITE位点间多态性) 标记开发，利用美国烟草基因组测序数据和MITE (miniature inverted repeat transposable element，微型反向重复转座元件) 结构特征，通过生物信息学方法获得11 581组具有特异TIR (terminal inverted repeat，末端重复元件) 序列的MITE及其多序列联配结果，并根据联配结果设计219条烟草IMP引物；利用9个不同类型烟草代表性品种进行测试，其中119条引物PCR扩增成功，引物开发成功率为54.6 %；进一步对一个烤烟遗传群体亲本‘红花大金元’和‘Hicks Broadleaf’进行标记筛选，共获得29个多态性标记，群体检测表明有21个标记可以整合定位到一个SSR标记遗传连锁图上. 说明IMP标记在烟草中是一种可以利用的分子标记，但跟其他标记一样表现出较低的多态性，需高通量检测平台与之配套来提高其开发效率.

关键词 烟草；微型反向重复转座元件 (MITE)； MITE位点间多态性 (IMP)；分子标记；遗传图谱
中图分类号 Q 78 **文献标志码** A

Development of tobacco inter-MITE polymorphism (IMP) markers and its application in genetic mapping. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2012, 38(6): 655-661

GAO Yu-long[1], GUI Yi-jie[2], XIAO Bing-guang[1*], BO Shi-ping[2], YAN Guang-hao[2], FAN Long-jiang[2] （*1. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi, Yunnan 653100, China; 2. Department of Agronomy, College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*）

Summary DNA transposable elements require the transposase from an autonomous parent element for transposition. The characteristic of MITEs are generally less than 500 bp with terminal inverted repeat (TIR) and target site duplication (TSD). MITEs often insert into insides of genes or regions near to genes, and therefore the markers based on TIRs of MITEs, termed inter-MITE polymorphism (IMP), are possibly lined to important agricultural traits and have been successfully used in barley, wheat, maize, oats etc. Extremely low polymorphism has been observed in tobacco by several molecular marker systems, such as RAPD, AFLP, ISSR, SRAP and SSR, due to its narrow genetic background during domestication. In this study, IMP markers were developed in tobacco using genomic sequences from the Tobacco Genome Initiative (TGI).

Non-redundant tobacco genomic sequences from TGI were used to scan MITEs through a bioinformatic approach and

---

基金项目：云南省科技厅资助项目 (2008CD194)；云南省烟草公司资助项目 (08A05).
[*]**通信作者** (Corresponding author)：肖炳光，E-mail: xiaobg@263.net
第一作者联系方式：高玉龙，E-mail: gyl3000@163.com
收稿日期 (Received)：2012-01-22；**接受日期** (Accepted)：2012-03-02；**网络出版日期** (Published online)：2012-11-14
URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/33.1247.S.20121114.1932.002.html

11 581 MITEs of unique TIRs were eventually identified and aligned (partial result was shown in Fig. 2). Two hundred and nineteen IMP primers were designed according to the alignments and then were tested among nine representative tobacco varieties with different types (flue-cured, burley, oriental and cigar tobacco) (Table 1). In the 219 primers, 119 were successfully amplified by PCR, which demonstrated a success rate of 54.6 % (partial result was shown in Fig. 3). The 119 primers were further used in a doubled haploid (DH) population of a flue-cured tobacco, 29 of which showed polymorphism between the two parental lines (Honghuadajinyuan/Hicks Broadleaf). Of the 29, 21 were genotyped in the DH population and integrated into seven linkage groups with SSR markers (Fig. 5).

Our results demonstrate that IMP markers are useful in tobacco such as genetic germplasm investigation and genetic map construction. But low development efficiency is also observed for this kind of marker system in tobacco. To improve the efficiency of IMP marker development, high-throughput detective/scanning platforms are needed in its genotyping process.

Key words *Nicotiana tabacum*; miniature inverted repeat transposable element (MITE); inter-MITE polymorphism (IMP); molecular marker; genetic map

转座元件 (transposable element) 是真核生物基因组的重要组成部分，它可以从一条染色体的一个位点转移到另一个位点，也可以从一条染色体转移到另一条染色体. 根据转座机制的不同，可将转座元件分为反转录转座元件 (retrotransposon) 和DNA转座元件 (DNA transposon). 反转录转座元件的转座过程以RNA为中间介体，这类转座元件在基因组中一般拷贝数较多. DNA 转座元件通过DNA中间体进行转座，其拷贝数较少. DNA转座元件又分为自主转座元件和非自主转座元件2个亚类. 微型反向重复转座元件 (MITE) 是一类特殊的转座元件，它最早在禾本科植物中被发现[1-3]. MITE拥有与非自主DNA转座元件相似的结构，其大小一般小于500 bp，缺少编码区，有末端反向重复 (TIR) 和靶位点重复 (target site duplication, TSD) 保守结构域，富含T/A等. 但MITEs具有高拷贝数、特征靶位点等特性，表明MITE与已鉴定出的非自主转座元件不同. 根据TSD保守序列，植物中的MITE可以分为Stowaway (TSD为TA) 和Tourist (TSD为TAA或TTA) 2大类.

MITE自身没有转座活性，需要DNA转座酶的作用. DNA转座酶与MITE的TIR结合并且介导MITEs的转座[4-7]. MITE易于插入到基因内或基因附近区域，而造成基因突变[8]. 所以基于MITE的分子标记可能与重要的农艺性状连锁. Chang等[9]通过序列相似性搜索大麦基因组序列，鉴定了大麦MITEs，并建立了基于MITE的分子标记技术即IMP (MITE位点间多态性)，这种标记根据MITE的TIRs设计引物，揭示了相邻2个MITE间的DNA多态性；试验还表明IMP标记技术可有效用于大麦、小麦、玉米、燕麦等禾本科植物的遗传图谱和指纹图谱的构建中.

烟草 (*Nicotiana tabacum*) 目前应用的分子标记主要有RAPD[10-11]、AFLP[12]、ISSR[13-14]、SRAP[15]、SSR[1,16]等. 由于烟草是异源四倍体作物，且栽培烟草的遗传基础比较狭窄，所以这些分子标记在栽培烟草品种间的多态性都比较低. 本文通过对烟草基因组序列数据进行分析，开发烟草IMP标记，期望增加烟草分子标记的种类，并探索该标记在烟草遗传图谱构建方面的应用.

1 材料与方法

1.1 烟草MITE候选序列搜索

美国烟草基因组测序计划 (Tobacco Genome Initiative, TGI) 释放的数据经拼接去冗余后作为寻找烟草 MITE 的原始数据. 利用 FINDMITE 软件和 MITE 结构特征 (图 1)，设定主要参数：1) TIR 长度为 11 bp，并允许 TIR 区域有 1 个碱基的错配；2) TSD 为 2~3 个碱基.

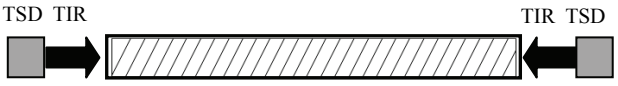


图 1 MITE 结构示意图

Fig. 1 Structure diagram of the MITE transposons

1.2 引物设计及扩增

根据烟草 MITE 多序列联配文件找到构成 MITE 的核心结构序列 (TIR 和 TSD). 以此 13~14 个

核心序列向两侧扩展，将引物序列长度控制在 17~22 bp 范围内. 除了进行单引物扩增外，筛选扩增稳定的 IMP 引物与其余的引物进行组合扩增.

PCR 反应体系参照 Chang 等[9]的方法，并作适当调整. 20 μL 反应体系包括 2.0 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L dNTPs，1.0 μmol/L 引物，1.0 U Taq DNA 聚合酶，DNA 模板 50 ng 左右. 本实验共设计 45 ℃、50 ℃和 55 ℃ 3 个退火温度（*T*m）梯度. 实验条件为 95 ℃预变性 5 min；接着在 95 ℃下变性 45 s，在对应退火温度下退火 45 s，72 ℃延伸 60 s，35 个循环；最后 72 ℃延伸 7 min.

扩增结果经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测. 检测程序为：4 μL PCR 产物 + 4 μL 上样缓冲液，95 ℃变性 5 min，冰浴备用. 电泳条件：60~70 W 预电泳 30 min，60~70 W 电泳 2 h. 电泳设备：北京六一 DYCZ-20C 型序列分析电泳槽；BIO-RAD HV 高电压电泳仪. 银染：固定液（10 %冰乙酸）固定 30 min；去离子水冲洗 3 次，每次 5 min；染色液 (0.2 % 硝酸银) 染色 30 min；去离子水漂洗时间不超过 10 s，立即拿出滴干；显影液显影直至得到清晰条带；终止液终止 3~5 min.

1.3　烟草材料

用于检验烟草 IMP 标记开发效率的 9 个不同类型代表性品种见表 1. 将种子播种于漂浮盘，漂浮盘置于温室中，待其长出 3 片真叶后，采用 CTAB 法提取基因组 DNA.

表 1　9 个用于本研究的烟草品种信息

Table 1　Types and origin of nine tobacco varieties used

品种名称 Varieties	类型 Types	起源 Origin
小黄金 1025 Xiaohuangjin 1025	烤烟 Flue-cured tobacco	山东 Shandong, China
红花大金元 Honghuadajinyuan	烤烟 Flue-cured tobacco	云南 Yunnan, China
K326	烤烟 Flue-cured tobacco	美国 America
Hicks Broadleaf	烤烟 Flue-cured tobacco	美国 America
Florida 301	雪茄烟 Cigar tobacco	美国 America
沙姆逊 Samsun	香料烟 Oriental tobacco	阿尔巴尼亚 Albania
白肋 21 Burley 21	白肋烟 Burley tobacco	德国 Germany
TN86	白肋烟 Burley tobacco	美国 America
土耳其巴斯玛 Turkey Basma	香料烟 Oriental tobacco	土耳其 Turkey

1.4　遗传作图

本实验室以‘红花大金元’和‘Hicks Broadleaf’间杂交 F_1 经花药培养、染色体加倍建立的双单倍体 (doubled haploid, DH) 作图群体为材料，构建了一张由 286 个 SSR 标记构成的烟草遗传图谱，利用该作图群体将开发的扩增结果稳定的烟草 IMP 标记采用 Mapmaker/EXP version 3.0b 软件定位于该图谱上，LOD = 3.0，最大距离 30 cM，用 Kosambi 函数将重组率转换成图距单位，cM.

2　结果与分析

2.1　烟草MITE的鉴定及IMP引物设计

美国 TGI 释放的原始基因组测序数据累计 870.7 Mb，对其进行拼接去冗余后获得 491.2 Mb 非冗余序列，处理后的序列作为搜索烟草 MITE 的基础序列. 应用 FINDMITE 软件搜索非冗余序列数据库总共获得 44 397 条符合 MITE 结构特征的序列. 这些序列按照 TIR 归类，选取在同一 TIR 结构下有 4 条序列以上的进行多序列联配，最终获得 11 581 组具有特异 TIR 的多序列联配结果. 图 2 为一组包括 7 条 MITE 的多序列联配结果.

根据烟草 MITE 联配结果设计烟草 IMP 引物 218 条，其中以 Stowaway 型 MITE (TSD 为 TA) 设计 100 条引物，Tourist 型 MITE (TSD 为 TTA 或 TAA) 设计 34 条引物，新类型 MITE 设计 84 条引物. 这些引物中包括了 Kuang 等[17]报道的 9 条 Mis 引物和 Bureau 等[18]专利文献中的 8 条 TEM 引物 (表 2).

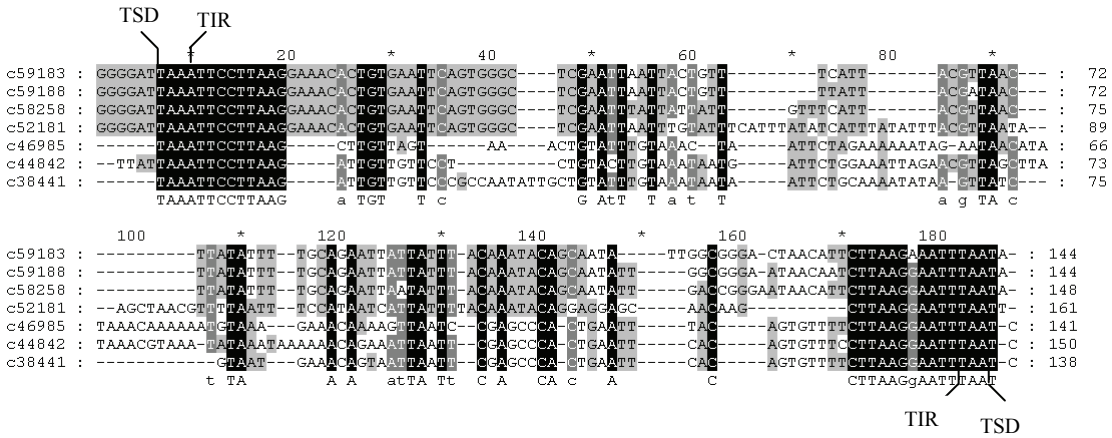


图 2 烟草 MITE 的多序列联配结果

Fig. 2 Multiple sequence alignment of tobacco MITEs

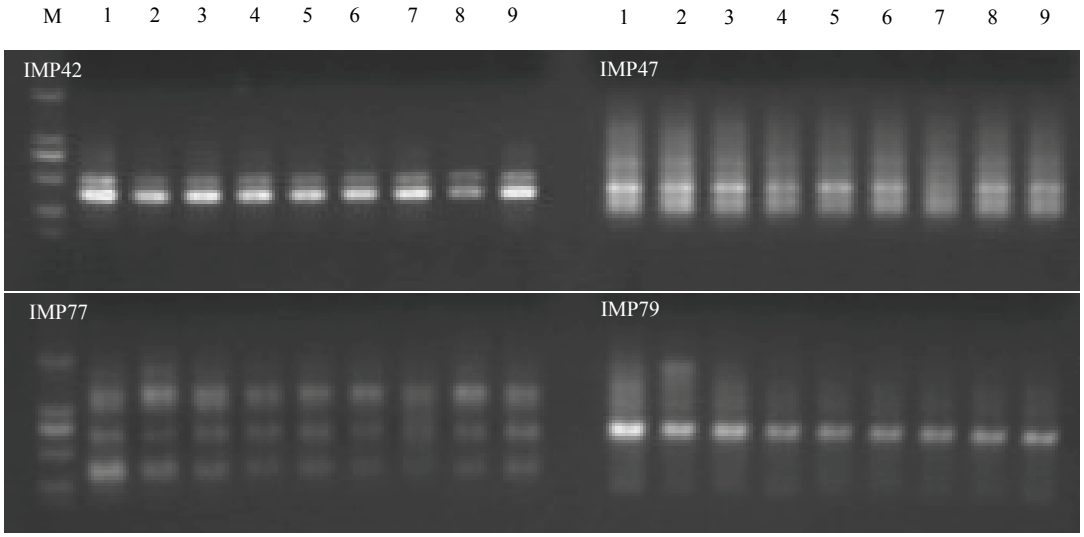
表 2 本研究开发的 IMP 引物信息

Table 2 IMP primers used in this study

引物名 Primer name	所属类别 Classification	数量 Number
TM002-TM091, TM169; TEM1, TEM8-11; Mis12, Mis15-17	Stowaway-like	100
TM170-TM199; TEM2, TEM3, TEM6; Mis18	Tourist-like	34
TM092-TM168; TEM4-5, TEM7; Mis1, Mis3-5	新类型 Novel type	84

2.2 IMP标记在烟草中的测试

以‘红花大金元’基因组 DNA 为模板，对开发的218条IMP引物在3个退火温度下进行测试. 结果显示，在 Tm＝50 ℃条件下，119 条引物能获得稳定的扩增产物，引物开发效率为 54.6 %，扩增产物大小为 100~1 500 bp 不等. 这 119 条候选引物在 9 个烟草材料上的测试表明，其扩增结果较稳定；部分结果见图 3.



M：DNA 标记；1~9：依次为小黄金 1025，红花大金元，K326，Hicks Broadleaf，Florida 301，沙姆逊，白肋 21，TN86 和土耳其巴斯玛.

Lane M: DNA marker; Lanes 1-9 represent Xiaohuangjin 1025, Honghuadajinyuan, K326, Hicks Broadleaf, Florida 301, Sumsun, Burley 21, TN86, and Turkey Basma, respectively.

图 3 IMP 引物在 9 个烟草代表性品种中的扩增结果

Fig. 3 PCR amplification of IMP primers in nine tobacco representative varieties

2.3　烟草IMP标记的遗传作图

烟草遗传基础狭窄，导致分子标记开发效率较低，所以其遗传图谱的构建非常困难. 为了检验 IMP 标记在烟草遗传作图中的应用前景，利用本实验室绘制的烤烟 SSR 遗传连锁图谱对本研究开发的 IMP 标记进行遗传定位. 将 119 条 IMP 引物在亲本‘红花大金元’和‘Hicks Broadleaf’间进行筛选，然后用筛选出的多态性引物对 207 个 DH 系进行分子标记分型分析. 在 119 条引物中，单引物扩增结果显示只有 TM86 和 TM197 各出现 1 个多态条带 (图 4 中箭头所指). 选取 10 条扩增结果较好的引物 (包括 TM86 和 TM197) 进行引物组合扩增，共 90 对组合. 14 对引物组合在亲本间扩增出 29 个多态性条带. 进一步利用这些有多态性的引物对 DH 群体各 DH 系进行标记分析，结果有 21 个标记分别定位于 7 条连锁群上 (图 5，表 3).

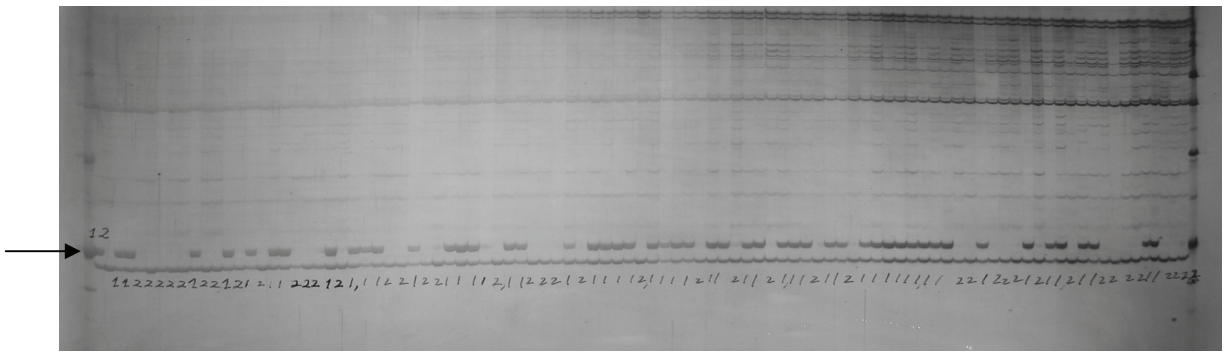
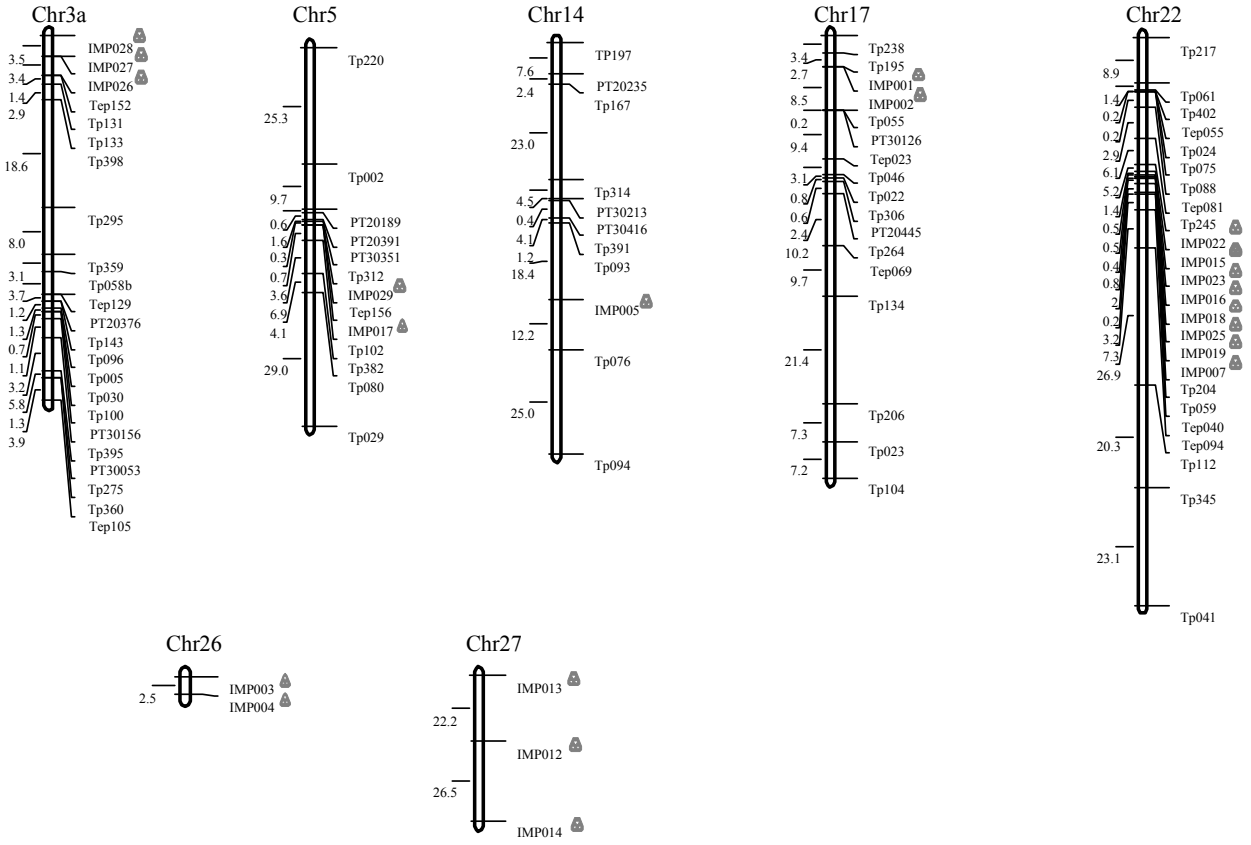


图 4　IMP 标记 TM197 在 DH 群体中的扩增结果

Fig. 4　Amplification result of IMP primer TM197 in tobacco DH population



IMP 标记 (见表 **3**) 用三角形标出. IMP markers (Table 3) are labeled with triangles.

图 5　烟草 IMP 和 SSR 标记遗传作图

Fig. 5　IMP + SSR genetic map of tobacco

表 3 遗传图谱 (图 5) 中 IMP 标记引物组合信息

Table 3 IMP primer or primer pairs on the genetic map in Fig. 5

图谱中的标记名 Marker names on the linkage map	引物或引物组合 Primers or primer pairs
IMP001	TEM1/TM018
IMP002	TEM1/TM018
IMP003	TEM1/TM018
IMP004	TEM1/TM157
IMP005	TM197
IMP007	TM86
IMP012	TM86/TM81
IMP013	TM86/TM81
IMP014	TM86/TM81
IMP015	TM86/TM83
IMP016	TM86/TM94
IMP017	TM86/TM94
IMP018	TM86/TM119
IMP019	TM86/TM128
IMP022	TM86/TM132
IMP023	TM86/TM146
IMP025	TM86/TM179
IMP026	TM162/TM106
IMP027	TM162/TM128
IMP028	TM162/TM131
IMP029	TM94/TM179

3 讨论

转座元件是真核生物基因组的基本组成成分[19-20]. 由于转座元件在基因组中分布广泛，而且具有序列保守性，人们已经开发了许多基于转座元件的分子标记，如 SSAP (sequence-specific amplification polymorphism)[21]、RIVP (retrotransposon internal variation polymorphism)[22] 和 IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) [23]等. MITE 属于 TIR 类转座子的一个家族. 到目前为止，鉴定的 MITE 主要属于 Stowaway 和 Tourist 2 类. 2001 年 Chang 等[9]根据 MITEs 的结构特点在大麦中开发了 IMP 标记，并且将开发的 88 个 IMP 标记定位于由 RFLP 标记绘制的大麦遗传图谱上；IMP 还可以有效应用于小麦、玉米、燕麦等禾本科植物上. Nakayama[24]利用 IMP 标记对 6 个甘蔗种 18 个品种进行了分类，IMP 标记能够较好地揭示甘蔗的进化历史. RAPD、AFLP、ISSR、SSR 等分子标记已经在烟草的种质资源分类、遗传图谱构建等方面得到了应用. 本研究首次鉴定了烟草 MITE 并将 IMP 标记应用于烟草上，表明该标记可以作为烟草的一种新分子标记类型使用，拓宽了应用于烟草中的分子标记种类.

本研究对开发的 218 条 IMP 引物在‘红花大金元’中进行测试，扩增成功率为 54.6 %，与同类型标记相似，但低于 EST-SSR 等单目标条带分子标记技术，EST-SSR 的扩展成功率为 60 %~90 %[25-27]. 跟其他分子标记一样，IMP 标记在烟草遗传群体中也表现出低多态性，这其中可能有几方面原因. 一是 IMP 标记的开发依赖于基因组序列测定的数量及质量. 本研究用于开发烟草 IMP 标记的数据来自于美国烟草基因组计划数据库，该数据库是烟草第一个基因组测序数据库，对其进行的评估结果表明该数据库提供的非冗余基因组序列覆盖烟草基因组的比例低于 10 %，非冗余基因组序列覆盖烟草功能基因的比例低于 18 %. 由于 MITE 易于插入到基因内或基因附近区域，所以推测根据该数据库搜索的 MITE 远远不能代表烟草基因组中的所有 MITE. 本研究中 IMP 表现出较低的多态性可能与此有关. 二是可能与烟草多倍体基因组有关. 由于高度同源导致的序列高相似度，多倍体基因组会导致一些在等位基因的变异难以检测到. 三是差异检测能力限制. 由于本试验使用的是小版胶系统，对差异条带的辨别能力相对较弱. 如果利用相对高通量的大版胶和荧光检测平台 (如 LI-COR4300 系统或 Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer)，预计可以大幅提高 IMP 在烟草中的开发效率.

References:

[1] Bureau T E, Wessler S R. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell*, 1992, 4: 1283-1294.

[2] Bureau T E, Wessler S R. Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell*, 1994, 6: 907-916.

[3] Bindler G, Plieske J, Bakaher N, *et al*. A high density genetic map of tobacco *(Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123: 219-230.

[4] Feschotte C, Osterlund M T, Peeler R, *et al*. DNA-binding specificity of rice mariner-like transposases and interactions with Stowaway MITEs. *Nucleic Acids Research*, 2005, 3: 2153-2165.

[5] Loot C, Santiago N, Sanz A, *et al*. The proteins encoded by the *pogo*-like *Lemi*1 element bind the TIRs and subterminal repeated motifs of the *Arabidopsis Emigrant* MITE: consequences for the transposition mechanism of MITEs. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: 5238-5246.

[6] Dufresne M, Hua-Van A, El Wahab H A, *et al*. Transposition of a fungal miniature inverted-repeat transposable element through the action of a *Tc1*-like transposase. *Genetics*, 2007, 175: 441-452.

[7] Miskey C, Papp B, Mátés L, *et al*. The ancient *mariner* sails again:

transposition of the human *Hsmar1* element by a reconstructed transposase and activities of the SETMAR protein on transposon ends. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27: 4589-4600.

[8] Feschotte C, Pritham E J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics*, 2007, 41: 331-368.

[9] Chang R Y, O'Donoughue L S, Bureau T E. Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 773-781.

[10] Coussirat J C. Genetic diversity and varietal identification in the species *Nicotiana tabacum* by RAPD markers. *Annales du Tabac Section*, 1994, 26: 1-7.

[11] 肖炳光, 卢江平, 卢秀萍, 等. 烤烟品种的RAPD分析. 中国烟草学报, 2000, 6(2): 10-15.

Xiao B G, Lu J P, Lu X P, *et al*. The classification of flue-cured tobacco varieties using RAPD analysis. *Acta Tabacaria Sinica*, 2000, 6(2): 10-15. (in Chinese with English abstract)

[12] Ren N, Timko M P. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 2001, 44(4): 559-57.

[13] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于ISSR标记的烤烟种质遗传多样性研究. 遗传, 2005, 27(5): 753-758.

Yang B C, Xiao B G, Chen X J, *et al*. Genetic diversity of flue-cured tobacco varieties based on ISSR markers. *Hereditas*, 2005, 27(5): 753-758. (in Chinese with English abstract)

[14] 肖炳光, 卢秀萍, 焦芳婵, 等. 烤烟几种化学成分的QTL初步分析. 作物学报, 2008, 34(10): 1762-1769.

Xiao B G, Lu X P, Jiao F C, *et al*. Preliminary QTL analysis of several chemical components in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(10): 1762-1769. (in Chinese with English abstract)

[15] 梁景霞, 祁建民, 吴为人, 等. 烟草DNA 的提取与SRAP 反应体系的建立. 中国烟草学报, 2005, 11(4): 33-38.

Liang J X, Qi J M, Wu W R, *et al*. DNA extraction and establishment of SRAP reaction system in tobacco. *Acta Tabacaria Sinica*, 2005, 11(4): 33-38. (in Chinese with English abstract)

[16] Bindler G, van der Hoeven R, Gunduz I, *et al*. A microsatellite marker based linkage map of tobacco. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114: 341-349.

[17] Kuang H, Padmanabhan C, Li F, *et al*. Identification of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the Solanaceae: new functional implications for MITEs. *Genome Research*, 2009, 19: 42-56.

[18] Bureau T E, Chang R Y, O'Donoughue L S. A novel type of transposon-based genetic marker. International patent, WO 00/60113. 2000-03-30.

[19] Pearce S R, Gill H, Li D, *et al*. The *Ty1-copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosome localization. *Molecular and General Genetics*, 1996, 250: 305-315.

[20] Suoniemi A, Anamthawat-Jonsson K, Arna T, *et al*. Retrotransposon *BARE*-1 is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30: 1321-1329.

[21] Waugh R, Melean K, Flavell A J, *et al*. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics*, 1997, 253: 687-694.

[22] Vershinin A V, Ellis T H N. Heterogeneity of the internal structure of PDR1, a family of TY1/copia-like retrotransposons in pea. *Molecular and General Genetics*, 1999, 262: 703-713.

[23] Kalendar R, Grob T, Regina M, *et al*. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 704-711.

[24] Nakayama S. Inter-MITE polymorphisms of a newly identified MITE show relationships among sugarcane (*Saccharum*) species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2012, 59: 1389-1396.

[25] Yu J K, Dake T M, Singh S, *et al*. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers for hexaploid wheat. *Genome*, 2004, 47(5): 805-818.

[26] Saha M C, Mian M A, Eujayl I, *et al*. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 783-791.

[27] Thiel T, Michalek W, Varshney R K, *et al*. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106: 411-422.