



研究报告 Research Report

金花茶植物物种鉴定的 dCAPS 标记开发及其应用

宋云^{1,2}✉, 徐晗¹✉, 许瑾^{1,2}✉, 赵竹^{1,2}✉, 李明福^{1,2}✉

1. 中国检验检疫科学研究院植物检疫研究所, 北京, 100029
2. 国家质检总局生物物种资源检测鉴定研究中心, 北京, 100029

✉ 通讯作者: sydef1016@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 26 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0026

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

宋云等, 2013, 金花茶植物物种鉴定的 dCAPS 标记开发及其应用, 分子植物育种(online), 11(26): 1190-1196 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0026)

引用格式(英文):

Song et al., 2013, Study of dCAPS Marker Technique in *Camellia nitidissima* Based on the SNP, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(26): 1190-1196 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0026)

摘要 金花茶是世界珍稀濒危的观赏植物, 属国家一级保护物种。为了防止金花茶重要基因资源流失, 便于口岸准确快速鉴定, 本文探索了基于 SNP 位点建立金花茶植物物种鉴定的 dCAPS 分子标记体系。本研究选取了山茶属金花茶组的 7 个种及属内近缘的 10 个种的材料, 对这些材料的 4 个 DNA 片段(*psbA-trnH*, *rbcL*, *trnL-F* 和 *GBSSI*) 进行了测序, 通过生物信息学方法对基因序列进行分析, 筛选 SNP 位点, 设计适当的错配引物进行 PCR 扩增, 选择合适的限制性内切酶进行酶切, 最终将 SNPs 转化为 dCAPS 标记进行检测, 建立了适用于口岸查验的金花茶物种的快速鉴定方法。

关键词 金花茶; 物种鉴定; SNP 位点; 错配引物; dCAPS 标记

Study of dCAPS Marker Technique in *Camellia nitidissima* Based on the SNP

Song Yun^{1,2}✉, Xu Han¹✉, Xu Jin^{1,2}✉, Zhao Zhu^{1,2}✉, Li Mingfu^{1,2}✉

1. Institute of Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing, 100029, PR. China
2. Biological Germplasm Resources Identification Center of AQSIQ, Beijing, 100029, PR. China

✉ Corresponding author, sydef1016@163.com; ✉ Authors

Abstract *Camellia nitidissima* Chi is a famous ornamental species that has rare and endangered status in the world. The dCAPS molecular markers system is established on the basis of the SNP to prevent the loss of important genetic resources and facilitate the fast, accurate identification of *Camellia nitidissima*. We sampled 7 species representing Sect. chrysantha and 10 closely-related species in *Camellia*. The nucleotide sequences of *psbA-trnH*, *rbcL*, *trnL-F* and *GBSSI* gene were analyzed by bioinformatics software to search for SNP loci for designing appropriate mismatch primer(s), allowing relevant endonuclease enzymes digestion and eventually transformed SNP into dCAPS markers, suitable for the rapid identification of species at Entry-Exit ports.

Keywords *Camellia nitidissima*; Species identification; Single nucleotide polymorphism (SNP); Mismatched primer; Derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS)

研究背景

金花茶(*Camellia nitidissima* Chi)属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)金花茶组(Sect. *Chrysantha*)的常绿灌木。据文献报道, 目前全球共有金花茶组植物24种5变种, 其中21种5变种分布于

中国南部及西南部地区(梁盛业, 1993, 林业出版社, pp.1-5), 因其花冠黄色而具有重要的园艺价值, 被誉为“茶花皇后”。近年来, 由于栖息地的丧失, 濒危物种资源的过度采集和非法出口贸易, 其自然种群急剧下降。金花茶被列为国家一级重点保护植物, IUCN红色名录中最濒危的植物种类之一。建立准确的金花茶植物鉴定方法是其生物多样性保护和研究的关键。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指由于单个核苷酸的变异所形成的遗传标记, 其数量多、多态性丰富、适于快速、自动化分

收稿日期: 2013 年 07 月 02 日

接受日期: 2013 年 07 月 03 日

发表日期: 2013 年 08 月 14 日

基金项目: 本研究由国家质检总局科技计划项目(2012IK295)、国家科技支撑计划项目(2012BAK11B01)、中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项(2012JK004)、国家质检总局物种资源检验检疫业务工作专项共同资助



析(Mochida et al., 2003)。SNP的检测方法有多种,如:基因测序技术、阵列杂交分析、高效变性液相色谱检测等(Jehan and Lakhanpaul, 2006),但是由于技术难度高、成本费用高,阻碍了其应用。酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)是根据SNPs位点的DNA序列设计特异的PCR引物,与限制性内切酶相结合产生的一种分子标记。但SNP恰好位于限制性酶切位点这种情况比较少,为了能够检测所有可能的SNPs位点,衍生型酶切扩增多态性序列(derived cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS)技术通过在扩增引物中加入错配碱基,结合SNP位点引入限制性内切酶位点,从而可以酶切检测几乎所有SNPs (Michaels and Amasino, 1998)。dCAPS技术自发明以来大量应用于分子遗传学及种质资源品种品系鉴定等方面研究,该技术已在水稻(Komori and Nitta, 2005; 赵红敬等, 2011)、拟南芥(Nemri et al., 2007; Hou et al., 2010)、小麦(Yanagisawa et al., 2003)、大麦(Shahinnia and Sayed-Tabatabaei, 2009)、葡萄(Boss and Thomas, 2002)、香蕉(Umali and Nakamura, 2003)、山茶(张成才等, 2012)等作物中得到了广泛的应用。

本研究通过对金花茶*psbA-trnH*、*rbcL*、*trnL-F*、*GBSSI*基因的PCR扩增,通过生物信息学方法进行SNP位点序列分析,设计金花茶物种特异的PCR引物,应用专一的限制性内切酶,最终将SNPs转化为dCAPS标记进行检测,建立了金花茶物种的快速鉴定方法。

1 结果与分析

1.1 序列比对及 SNP 位点分析

对金花茶组植物 *psbA-trnH*、*rbcL*、*trnL-F*、*GBSSI* 基因的序列进行分析,四个基因的扩增效率均为100%,扩增序列片段长度排序后分别为 469 bp、

732 bp、976 bp、759 bp, *GBSSI* 基因序列提供最多的变异位点(53 个)及最多的信息位点(21 个)(表 1)。因此,后续选择 *GBSSI* 基因序列对金花茶组植物进行物种特异引物的设计。

1.2 dCAPS 标记的转化

序列比对分析中发现金花茶的 *GBSSI* 基因的第 141 个碱基为 T, 而其它种为 C (图 1)。根据此 SNP 位点设计合成 dCAPS 引物(图 2; 表 3), 错配碱基为 C→A(图 2)。dCAPS 引物和下游引物 PCR 扩增出单一的目的条带为 254 bp, 结果与预期一致(图 3A)。用相应的限制性内切酶对扩增产物进行酶切, 酶切产物中只有金花茶(图 3B)有 254 bp 和 229 bp 两个片段, 而其它近源种只有一个 254 bp 片段, 从而将金花茶与其它近源种分开。

2 讨论

单核苷酸多态性标记因为数量多、分布广泛、适于快速规模化筛选等优点在遗传图谱构建、种质资源遗传多样性、分子育种等领域有广泛的应用前景。SNP的开发和检测技术也不断发展成熟。目前,发掘SNP标记的方法主要包括:基于表达序列标签(expressed sequence tag, EST)数据开发SNP位点、基于微阵列芯片开发SNP、扩增子重测序开发SNP和基于全基因组序列的SNP标记开发(洪彦彬等, 2011; 张成才, 2012)。SNP的检测技术多种多样,如:凝胶分析技术、荧光检测技术、DNA芯片检测、质谱检测技术和色谱技术等,但是它们多数对设备和技术要求高,成本较高(张成才, 2012)。

本实验针对金花茶物种设计了特异引物,能迅速地将金花茶与山茶属其它近源种区分,其中dCAPS引物的设计是将SNP转化为dCAPS标记的关键,通过软件共设计了16个dCAPS上游引物,

表 1 四个基因片段的信息参数

Table 1 Informative parameters of the four DNA regions

| | <i>psbA-trnH</i> | <i>rbcL</i> | <i>trnL-F</i> | <i>GBSSI</i> |
|--|------------------|-------------|---------------|--------------|
| 长度范围(bp) | 396~459 | 697~722 | 919~954 | 652~749 |
| Length range (bp) | | | | |
| 排列长度(bp) | 469 | 732 | 976 | 759 |
| Aligned length (bp) | | | | |
| 变异位点(%) | 6 (1.28%) | 1 (0.14%) | 9 (0.92%) | 53 (6.98%) |
| No. of variable sites (%) | | | | |
| 信息位点(%) | 6 (1.28%) | 1 (0.14%) | 1 (0.10%) | 21 (2.77%) |
| No. of parsimony informative sites (%) | | | | |

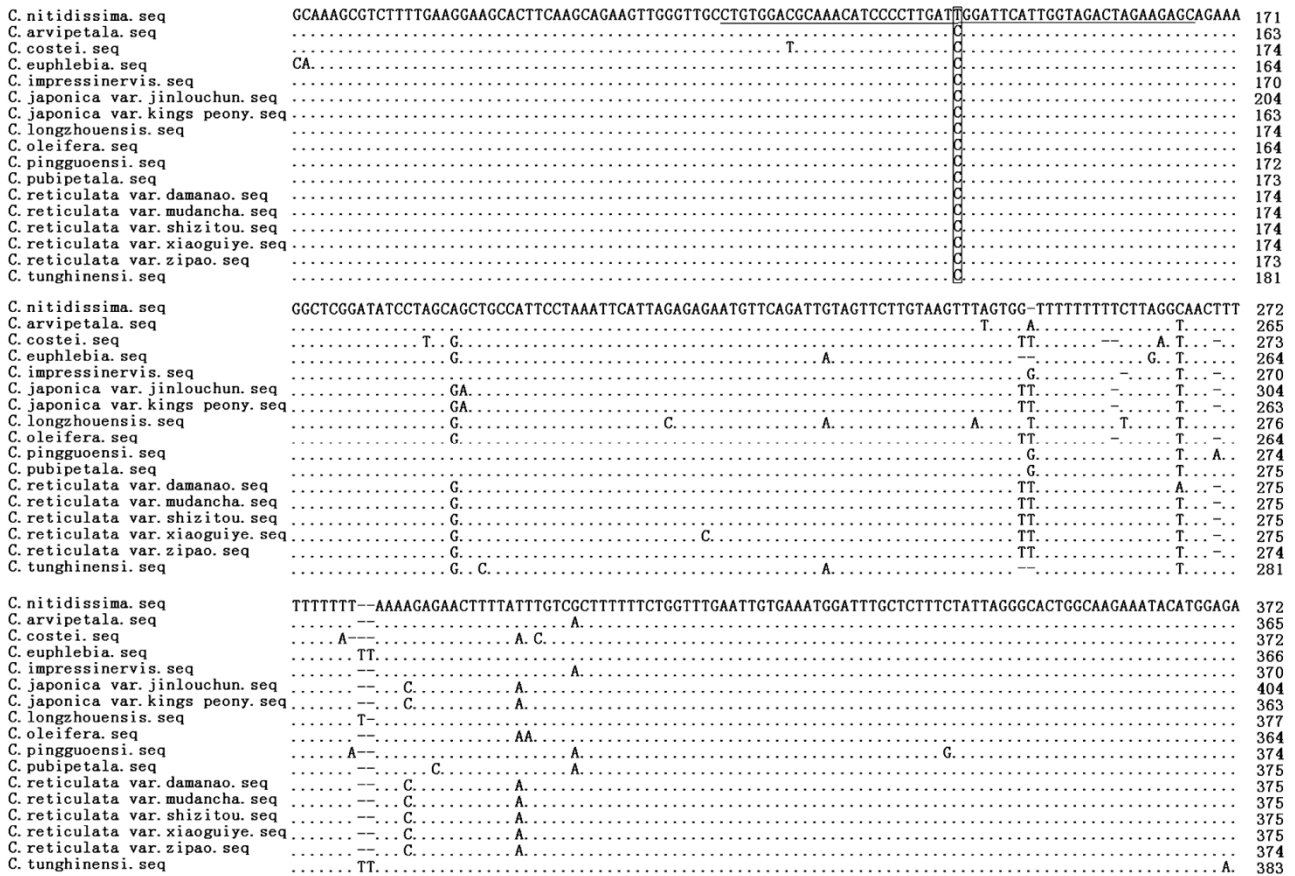


图 1 金花茶与其它近源种的 *GBSSI* 基因部分序列比对分析

注：方框标注为本实验中所用 SNP 位点；下划线序列为 dCAPS 引物设计所用目标序列

Figure 1 Partial sequence alignment of the *GBSSI* gene region showing the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) between *C. nitidissima* and other closely-related species

Note: The box shows the SNPs used in this study; The underlined sequences were entered to the dCAPS Finder 2.0 program for dCAPS primer design

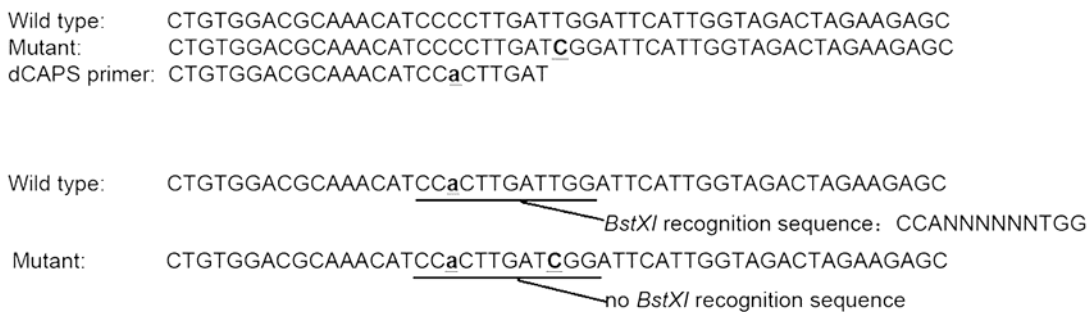


图 2 金花茶 dCAPS 引物设计

注：下划线的大写字母表示 1 个 SNP；下划线的小写字母表示引物中设置的错配碱基

Figure 2 The design of dCAPS primer

Note: The capital letter with an underline indicates a SNP and the lowercase with an underline indicates a mismatch base in a dCAPS primer; *C. nitidissima* is designated as wild-type and other species as mutant

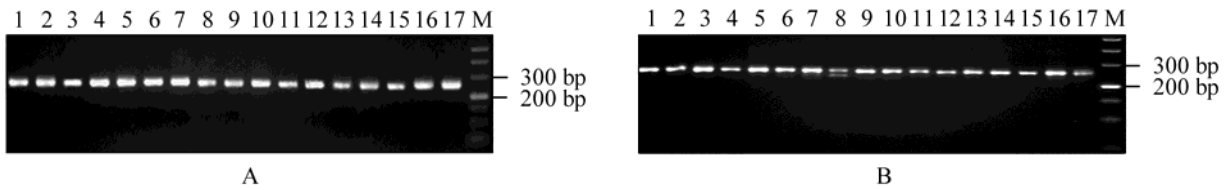


图3 dCAPS 标记鉴定金花茶的 PCR 分析

注: M: DL500 DNA marker; A: 酶切前 PCR 产物, DNA 片段为 254 bp; B: *Bst*XI 酶切后 PCR 产物; 1~17: 对应样品名称见表 2; 1~7, 9~17: DNA 片段为 254 bp; 8: DNA 片段为 229 bp

Figure 3 PCR analysis for identification of *C. nitidissima* using dCAPS marker system

Note: M: DL500 DNA marker; A: Electrophoresis profiles of uncut PCR products; Molecular size of DNA fragments are 254 bp; B: PCR products after digestion with *Bst*XI; 1~17: Corresponds to the voucher number in Table 2; 1~7, 9~17: Molecular size of DNA fragments are 254 bp; 8: Molecular size of DNA fragments are 229 bp

引物中错配碱基的数目、距离引物3'端的位置都会影响标记的应用(Neff et al., 2002; Neff et al., 1998)。本实验选择了错配碱基数目为1个, 距离3'端第6位置的引物, PCR产物经酶切后得到与预期相同的结果。表明错配碱基在距离引物3'端较远的位置能够引入PCR扩增产物中, 从而在包含目的SNP的目标DNA中创建了一个特异性酶切位点。鉴于此方法建立了基于SNPs的dCAPS标记技术鉴定金花茶物种的方法体系, 从而达到可以快速、准确检测物种特异SNPs的目的, dCAPS标记的成功开发, 对于口岸物种查验工作及品种资源鉴别、种质资源保护具有重大意义。

表2 实验所用植物材料

Table 2 Plant materials in this study

| 凭证标本号 Voucher number | 物种名 Species | 采集地 Origin | GenBank 序列号 GenBank accession NO. |
|-------------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|
| CAIQH01 | 毛瓣金花茶 <i>Camellia pubipetala</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC844915 |
| CAIQH02 | 显脉金花茶 <i>Camellia euphlesia</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC878512 |
| CAIQH03 | 凹脉金花茶 <i>Camellia impressinervis</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC878513 |
| CAIQH04 | 东兴金花茶 <i>Camellia tungghinensi</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC878514 |
| CAIQH05 | 平果金花茶 <i>Camellia pingguoensis</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC878515 |
| CAIQH06 | 龙州金花茶 <i>Camellia longzhouensis</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC878516 |
| CAIQH07 | 小瓣金花茶 <i>Camellia parvipetala</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC878517 |

3 材料与方法

3.1 试剂与材料

DNA提取所用试剂购自TIANGEN公司, PCR扩增所用试剂及限制性内切酶均购自Takara公司。实验所用植物材料(表2), 所有供试植物材料均为硅胶干燥保存的叶片。

3.2 方法

3.2.1 DNA 提取和条码基因扩增及测序

金花茶物种基因组DNA提取按照TIANGEN植物基因组DNA提取试剂盒进行, 并将提取的DNA置于-20℃下保存备用。

续表 1

Continuing table 1

| 凭证标本号 Voucher number | 物种名 Species | 采集地 Origin | GenBank 序列号 GenBank accession NO. |
|-------------------------|--|--------------------------|--------------------------------------|
| CAIQH08 | 金花茶 <i>Camellia nitidissima</i> | 广西南宁 Nanning, Guangxi | KC878518 |
| CAIQH09 | 华东山茶-“牡丹王” <i>Camellia japonica</i> var. “kings peony” | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878519 |
| CAIQH10 | 华东山茶-“锦楼春” <i>Camellia japonica</i> var. “jinlouchun” | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878520 |
| CAIQH11 | 云南山茶-“狮子头” <i>Camellia reticulata</i> . var. “shizitou” | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878521 |
| CAIQH12 | 云南山茶-小桂叶 <i>Camellia reticulata</i> . var. “xiaoguiye” | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878522 |
| CAIQH13 | 云南山茶-牡丹茶 <i>Camellia reticulata</i> . var. “mudanacha” | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878523 |
| CAIQH14 | 云南山茶-“大玛瑙” <i>Camellia reticulata</i> . var. “damanao” | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878524 |
| CAIQH15 | 云南山茶-“紫袍” <i>Camellia reticulata</i> . var. “zipao” | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878525 |
| CAIQH16 | 油茶 <i>Camellia oleifera</i> Abel. | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878526 |
| CAIQH17 | 贵州连蕊茶 <i>Camellia costei</i> Levl. | 云南昆明 Kunming, Yunnan | KC878527 |

根据文献中条码基因 *psbA-trnH* (Kress and Erickson, 2007)、*rbcL* (Kress and Erickson, 2007)、*trnL-F* (Taberlet et al., 1991)、*GBSSI* (杨俊波等, 2006) 的引物及扩增条件(表2)进行扩增, PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测并在紫外凝胶成像系统观察合格后, 由中国农科院测序中心测序。

3.2.2 序列比对及物种特异的 dCAPS 标记的开发

序列编辑和拼接应用 CodonCode Aligner V3.0 (CodonCode Co., USA), 17个物种的GBSSI基因序列提交 GenBank 并获得序列号 KC844915, KC878512-KC878527 (表1)。通过DNAMAN software 进行序列比对寻找合适的SNP位点。

利用dCAPS Finder 2.0 program (Neff et al., 2002)

和Primer Premier 5.0分别设计dCAPS引物及相应的下游引物(表3), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。以17个山茶属物种基因组DNA为模板, 25 μ L PCR反应体系包括: 2.5 μ L 10 \times EX Taq buffer (Mg²⁺ Plus), 2 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 上下游引物 (10 μ mol/L)各1 μ L, 0.2 μ L EX Taq DNA polymerase (5 U/ μ L), 1 μ L基因组DNA (50 μ g/ μ L)。PCR扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C终延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C保存(宋云等, 2012)。PCR扩增结束后, 采用限制性内切酶*BstXI*酶切, 酶切反应体系参照Takara内切酶说明书进行, 酶切产物经过2.5% MetaPhor agarose电泳检测, 通过紫外凝胶成像系统记录结果。



表3 本文所用 PCR 扩增引物

Table 3 Primers used in the study

| 基因名称 Name | DNA 熔解温度(°C) T _m (°C) | 引物序列(5'-3') Sequence (5'-3') | 参考文献 References |
|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| <i>psbA-trnH</i> | 56 | fwd PA: GTTATGCATGAACGTAATGCTC | Kress and Erickson, 2007 |
| | 64 | rev TH: CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC | |
| <i>rbcL</i> | 56 | 1f: ATGTCACCACAAACAGAAAC | Kress and Erickson, 2007 |
| | 62 | 724r: TCGCATGTACCTGCAGTAGC | |
| <i>trnL-F</i> | 62 | trnL: CGAAATCGGTAGACGCTACG | Taberle et al., 1991 |
| | 58 | TrnF: ATTTGAACTGGTGACACGAG | |
| <i>GBSSI</i> | 56 | F1: TGCCACCACTGTAAGATTC | Yang et al., 2006 |
| | 58 | R2: CCTTCTTTTCACAGTGTCAAC | |
| dCAPS primer | 62 | CTGTGGACGCAAACATCCACTTGAT | 本文作者设计 |
| 下游引物 Reverse primer | 62 | CCATGTATTTCTTGCCAGTGCCCT | Designed by the authors |

作者贡献

宋云、徐晗是本研究的实验设计和实验研究的执行人；许瑾、赵竹完成数据分析，论文初稿的写作；李明福参与实验设计，试验结果分析；宋云是项目的构思者及负责人，指导实验设计，数据分析，论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家质检总局科技计划项目(2012IK295)、国家科技支撑计划项目(2012BAK11B01)、中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项(2012JK004)、国家质检总局物种资源检验检疫业务工作专项共同资助

参考文献

- Boss P.K., and Thomas M.R., 2002, Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation, *Nature*, 416(6883): 847-850
<http://dx.doi.org/10.1038/416847a>
PMid:11976683
- Hong Y.B., Li X.Y., and Liang X.Q., 2011, Advance on developing SNP marker in plants, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding)*, 9(111): 1807-1817 (洪彦彬, 李杏瑜, 梁炫强, 2011, 植物 SNP 的开发研究进展, *分子植物育种(online)*, 9(111): 1807-1817)
- Hou X., Li L., Peng Z., Wei B., Tang S., Ding M., Liu J., Zhang F., Zhao Y., Gu H., and Qu L.J., 2010, A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 63(5): 880-888
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04277.x>
PMid:20561258

- Jehan T., and Lakhanpaul S., 2006, Single nucleotide polymorphism (SNP)-methods and applications in plant genetics: a review, *Indian Journal of Biotechnology*, 5(4): 435-459
- Komori T., and Nitta N., 2005, Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers, *Breeding Science*, 55(1): 93-98
<http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.55.93>
- Kress W.J., and Erickson D.L., 2007, A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region, *PLoS One*, 2(6): e508
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
PMid:17551588 PMCID:PMC1876818
- Michaels S.D., and Amasino R.M., 1998, A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR, *Plant J.*, 14(3): 381-385
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00123.x>
PMid:9628032
- Mochida K., Yamazaki Y., and Ogihara Y., 2003, Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags, *Mol. Genet Genomics*, 270(5): 371-377
<http://dx.doi.org/10.1007/s00438-003-0939-7>
PMid:14595557
- Neff M.M., Neff J.D., Chory J., and Pepper A.E., 1998, dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics, *Plant J.*, 14(3): 387-392

- <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00124.x>
PMid:9628033
- Neff M.M., Turk E., and Kalishman M., 2002, Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis, *Trends Genet.*, 18(12): 613-615
[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02820-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02820-2)
- Nemri A., Neff M.M., Burrell M., Jones J.D., and Studholme D.J., 2007, Marker development for the genetic study of natural variation in *Arabidopsis thaliana*, *Bioinformatics*, 23(22): 3108-3109
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm501>
PMid:18025007
- Shahinnia F., and Sayed-Tabatabaei B.E., 2009, Conversion of barley SNPs into PCR-based markers using dCAPS method, *Genet. Mol. Biol.*, 32(3): 564-567
<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572009005000047>
PMid:21637520 PMCID:PMC3036059
- Song Y., Chen Y., Xu H., Li M.F., and Liu S.Q., 2012, Analysis of single-copy nuclear *TPI* Gene Sequences of *Oryza L.* and its application in identification of *Oryza granulata*, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, (12): 76-81 (宋云, 陈岩, 徐晗, 李明福, 刘仕琴, 2012, 稻属单拷贝核基因 *TPI* 序列分析及其在疣粒野生稻鉴定中的应用, *生物技术通报*, (12): 76-81)
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., and Bouvet J., 1991, Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Mol. Biol.*, 17(5): 1105-1109
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00037152>
PMid:1932684
- Umali P.R., and Nakamura I., 2003, Identification of dCAPS markers that discriminate A and B cytoplasms in banana (*Musa spp.*), *Plant Biotechnology*, 20(2): 159-164
<http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.159>
- Yanagisawa T., Kiribuchi-Otobe C., Hirano H., Suzuki Y., and Fujita M., 2003, Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker, *Theor. Appl. Genet.*, 107(1): 84-88
PMid:12669198
- Yang J.B., Li H.T., Yang S.X., Li D.Z., and Yang Y.Y., 2006, The application of four DNA sequences to studying molecular phylogeny of *Camellia* (Theaceae), *Yunnan Zhiwu Yanjiu (Acta Botanica Yunnanica)*, 28(2): 108-114 (杨俊波, 李洪涛, 杨世雄, 李德铎, 杨莹燕, 2006, 四个 DNA 片段在山茶属分子系统学研究中的应用, *云南植物研究*, 28(2): 108-114)
- Zhang C.C., 2012, The development and application of SNPs in tea plant (*Camellia sinensis*), Thesis for M.S., Chinese Academy of Agricultural Sciences, Supervisor: Cheng H., pp.2-25 (张成才, 2012, 茶树 SNP 标记的开发与应用, 硕士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 成浩, pp.2-25)
- Zhang C.C., Wang L.Y., Wei K., Cheng H., Bao Y. X., Liu B.Y., and Wang Y.G., 2012, Study of SNP and relative dCAPS markers in tea plant (*Camellia sinensis*), *Chaye Kexue (Journal of Tea Science)*, 32(6): 517-522 (张成才, 王丽鸳, 韦康, 成浩, 包云秀, 刘本英, 汪云刚, 2012, 基于茶树 SNP 的 dCAPS 标记体系研究, *茶叶科学*, 32(6): 517-522)
- Zhao H.J., Xu J., Gao B.D., Xu T., and Zhu S.F., 2011, The establishment of dCAPS markers system in *Oryza punctata* and *Oryza officinalis* on the basis of the SNP, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 9(2): 169-173 (赵红敬, 许瑾, 高必达, 徐涛, 朱水芳, 2011, 基于 SNP 位点快速鉴定药用、斑点野生稻的 dCAPS 标记体系的建立, *分子植物育种*, 9(2): 169-173)