

油茶 SSR-PCR 反应体系建立与优化

刘冰¹, 金龙¹, 曹翠萍^{1*}, 王勤¹, 周明善², 吴山忠², 束庆龙¹, 张良富¹

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036; 2. 安徽省歙县特种经济林场, 歙县 245900)

摘要: 油茶是我国特有的木本食用油料树种, 本研究采用正交试验和单因素试验, 建立并优化了油茶 SSR-PCR 反应体系。结果表明, 油茶最适 SSR-PCR 反应体系为模板 DNA ($5\sim 10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1.0\ \mu\text{L}$, Mg^{2+} ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.7\ \mu\text{L}$, dNTP ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.15\ \mu\text{L}$, 正反向引物均为 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.2\ \mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 ($5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.1\ \mu\text{L}$, $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $1.0\ \mu\text{L}$, HPLC 水 $6.65\ \mu\text{L}$, 总体积 $10.0\ \mu\text{L}$; 同时证明了微卫星位点在山茶属 (*Camellia* L.) 植物的种间通用性。研究结果将为油茶遗传多样性研究、品种鉴定、亲缘关系分析以及重要农艺性状的 QTL 研究提供重要的理论依据和技术支持。

关键词: 油茶; 微卫星标记; PCR 反应体系; 优化

中图分类号: S794.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)06-0858-05

Establishment and optimization of SSR-PCR reaction system for oil tea (*Camellia oleifera* Abel.)

LIU Bing¹, JIN Long¹, CAO Cui-ping¹, WANG Qin¹, ZHOU Ming-shan²,
WU Shan-zhong², SHU Qing-long¹, ZHANG Liang-fu¹

(1. School of Forestry & Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Special Economic Forestry Centre of Shexian County of Anhui Province, Shexian 245900)

Abstract: *Camellia oleifera* Abel. is an edible oil tree species native to China. SSR-PCR reaction system for *C. oleifera* was established and optimized through orthogonal test and single factor experiment. The results revealed that the optimal SSR-PCR reaction system was $10.0\ \mu\text{L}$ volume containing DNA ($5\sim 10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $1.0\ \mu\text{L}$, Mg^{2+} ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.7\ \mu\text{L}$, dNTP ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.15\ \mu\text{L}$, F- and R-primer ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.2\ \mu\text{L}$, respectively, Taq DNA ($5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.1\ \mu\text{L}$, $10\times\text{PCR}$ buffer $1.0\ \mu\text{L}$, HPLC H_2O $6.65\ \mu\text{L}$. The cross-species transferability of SSR loci within genus *Camellia* was validated. Information of the study may offer theoretical base and technical support to assessment of genetic diversity, identification of variety, phylogenetic study and QTL analysis of *C. oleifera* in the future.

Key words: *Camellia oleifera* Abel.; SSR; PCR reaction system; optimization

微卫星 (microsatellites) 又称简单序列重复 (simple sequence repeats, SSRs) 或短串联重复 (short tandem repeats, STRs) DNA, 是以 1-6 个碱基为基本单元的串联重复序列, 广泛存在于各种真核生物的基因组中^[1-2], 具有含量丰富、多态性高、共显性、检测方法简单、准确率高、稳定可靠等优点^[3], 已被广泛应用于遗传多样性度量^[4]、遗传图谱构建^[5]、种质鉴定^[6]、亲缘关系分析^[7] 等研究领

域。由于微卫星 DNA 侧翼序列在基因组中是相对保守的单拷贝序列, 尤其在亲缘关系相近的物种间保守程度较高, 因此, 某一物种的微卫星引物可以在其相近的物种中使用^[8-10], 同样, 微卫星标记在山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia* L.) 不同种间的通用性也已有研究和报道^[11-14]。

油茶狭义上是指普通油茶 (*Camellia oleifera* Abel.), 广义上则通常指山茶科 (Theaceae) 山茶属

收稿日期: 2011-05-16

基金项目: 安徽省人才开发专项资金 (2008Z023), 安徽农业大学引进与稳定人才科研资助 (yj2008-3), 安徽省自然科学基金 (090411025) 共同资助。

作者简介: 刘冰, 女, 硕士研究生。

* 通讯作者: 曹翠萍, 女, 教授。Email: cuipingcao@163.com

(*Camellia* L.) 植物中油脂含量较高且有栽培经济价值的一类植物的总称, 是我国特有的木本食用油料树种^[15-16]。为了开发油茶资源, 我国科技工作者在油茶的栽培与常规育种方面做了大量的工作, 近年来分子标记技术如 RAPD^[17]、ISSR^[18-19] 和 SRAP^[20] 开始应用于油茶技术研究, 但微卫星标记在油茶研究上的运用, 国内外尚未见报道。因此, 本研究旨在建立和优化油茶 SSR-PCR 反应体系, 为油茶遗传多样性研究、品种亲缘关系分析以及重要农艺性状的 QTL 研究提供理论和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验所用材料名称、原产地和采集地见表 1, 包括油茶 3 个种的 11 个品种 (编号 1-5, 8-13) 和 2 个优良单株 (编号 6-7), 1~11 号为普通油茶 *C.*

oleifera ($2n = 2x = 30$)^[21], 12、13 号分别为南荣油茶 *C. nanyongensis* 和小果油茶 *C. meiocarpa*。从样本树采集嫩叶, 并将灰尘脏物擦拭干净, 分别编号, 与硅胶干燥保存于塑料袋中, 带回实验室, 并放于冰箱 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 从每个样本取一小片冷冻叶片 (约 2 cm^2 , $50\sim 100\text{ mg}$), 用细胞破碎仪 TissueLyser II 破碎后采用试剂盒 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 德国) 抽提 DNA。取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 抽提产物在 0.8% 琼脂糖凝胶、 100 V 电压和 TAE 缓冲液条件下电泳 30 min. , 经 EB 染色后在紫外灯下拍照, 检测 DNA 提取是否成功。利用 UV 754 紫外分光光度计测定 DNA 浓度与纯度, OD 值 (A_{260}/A_{280}) 约为 1.8 , $500\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 再将 DNA 稀释 100 倍, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用 (图 1)。

表 1 试验材料

Table 1 Samples used in the study

编号 No.	材料名称 Name	拉丁学名 Scientific name	原产地 Geographical origin	采集地 Sampling location
1	大别山1号	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Dabieshanensis 1	安徽	安徽舒城德昌苗木有限公司
2	大别山4号	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Dabieshanensis 4	安徽	安徽舒城德昌苗木有限公司
3	湘油6号	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Xiangyouensis 6	湖南	安徽舒城德昌苗木有限公司
4	赣兴6	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Ganxingensis 6	江西	安徽舒城德昌苗木有限公司
5	长林11	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Changlinensis 11	江西	安徽舒城德昌苗木有限公司
6	优良单株1号	<i>C. oleifera</i> Abel. 1	安徽	安徽凤阳梅市油茶园
7	优良单株2号	<i>C. oleifera</i> Abel. 2	安徽	安徽凤阳梅市油茶园
8	黄山4号	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Huangshanensis 4	安徽	安徽黄山林业科学研究所
9	徽州大红	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Huizhou-dahong	安徽	安徽黄山林业科学研究所
10	皖徽3号	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Wanhuiensis 3	安徽	安徽歙县岩寺林场
11	徽州小红	<i>C. oleifera</i> Abel. cv. Huizhou-xiaohong	安徽	安徽歙县岩寺林场
12	南荣油茶	<i>C. nanyongensis</i> Hu	广西	安徽歙县岩寺林场
13	小果油茶	<i>C. meiocarpa</i> Hu	江西	安徽歙县岩寺林场

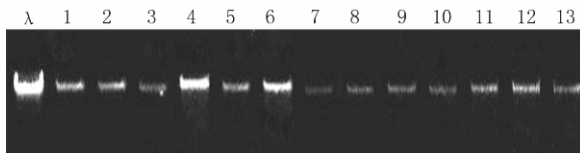


图 1 油茶基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Genomic DNA of *C. oleifera* on agarose gel

1.2.2 SSR-PCR 反应体系的建立和优化 由于 SSR-PCR 反应体系所含组分比较多, 各组分及其相互作用均可能对扩增效果有影响, 而正交试验设计又可以进行多因素的联合优化。因此, 本试验参考相关文献的 SSR-PCR 反应体系, 首先对 DNA 模板、

Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* 酶用量进行 5 因素 4 水平的探索性正交试验 (表 2 和表 3)。通过对正交试验设计表 (表 3) 中 16 个反应体系分别进行测试, 找出扩增效果较好的组合, 确定为较合适的反应体系。然后再采用单因素完全试验设计优化这一反应体系, 即逐一变化 5 个因素中某一因素的用量, 同时固定其他 4 个因素, 研究各因素不同处理水平对 PCR 扩增效果的影响, 最后确定最优的因素组合, 以获得清晰、可重复和可靠性较高的谱带。

SSR-PCR 试验所用分子量标准 (Trans2K™ Plus DNA Marker) 购自北京全式金生物技术有限公司 (TransGen Biotech), 其他试剂均购自上海生工

生物工程技术服务有限公司(Sangon),采用 Sharma等^[13]为茶(*C.sinensis*)开发的引物 TUGMS23,序列为 F: 5' GGGGAGCTTACAAAGAGTCA 3'和 R: 5' GTGCCGAAGAGAGGATAGAG 3',由 Sangon 公司合成。PCR 反应总体积为 10.0 μL ,除包括表 2 和表 3 中的 5 个因素外,每反应管中还含有 1.0 μL 10 \times PCR 缓冲液,总体积不足 10.0 μL 时,用 HPLC 超纯水补齐。PCR 反应在 Biometra PCR 仪 (TProfessional Standard Gradient 96) 上进行,扩增

程序参照 Zhao 等^[12],94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 35 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶、100 V 电压和 TAE 缓冲液条件下电泳 30 min.,经 EB 染色,紫外灯下拍照,检测扩增效果。确定最佳 SSR-PCR 反应体系后,扩增产物在 4.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶、1 \times TBE 缓冲液、电源功率 30 W 条件下电泳 6 h,再经 0.1% 硝酸银染色,拍照以供分析。

表 2 油茶 SSR-PCR 反应体系的正交设计因素水平

Table 2 Factors and levels of SSR-PCR system of *C. oleifera* for orthogonal design

水平 Level	因素 Factors				
	DNA (5~10 ng· μL^{-1})	Mg ²⁺ (25 mmol·L ⁻¹)	dNTP (10 mmol·L ⁻¹)	Primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Taq-polymerase (5 U· μL^{-1})
1	0.50	0.50	0.15	0.20	0.05
2	1.00	0.70	0.25	0.30	0.10
3	1.50	0.90	0.35	0.40	0.15
4	2.00	1.10	0.45	0.50	0.20

注:表中各因素变量单位为 μL 。下同。

Note: The variable unit of all the factors in the table is used as μL . The same below.

表 3 油茶 SSR-PCR 反应的正交试验设计[L₁₆(4⁵)]

Table 3 The orthogonal experimental design of SSR-PCR [L₁₆(4⁵)] for *C. oleifera*

水平 Level	因素 Factors				
	DNA (5~10 ng· μL^{-1})	Mg ²⁺ (25 mmol·L ⁻¹)	dNTP (10 mmol·L ⁻¹)	Primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Taq-polymerase (5 U· μL^{-1})
1	0.50	0.50	0.15	0.20	0.05
2	0.50	0.70	0.25	0.30	0.10
3	0.50	0.90	0.35	0.40	0.15
4	0.50	1.10	0.45	0.50	0.20
5	1.00	0.50	0.25	0.40	0.20
6	1.00	0.70	0.15	0.30	0.15
7	1.00	0.90	0.45	0.20	0.10
8	1.00	1.10	0.35	0.50	0.05
9	1.50	0.50	0.35	0.30	0.10
10	1.50	0.70	0.45	0.40	0.05
11	1.50	0.90	0.15	0.50	0.20
12	1.50	1.10	0.25	0.20	0.15
13	2.00	0.50	0.45	0.30	0.15
14	2.00	0.70	0.35	0.20	0.20
15	2.00	0.90	0.25	0.50	0.05
16	2.00	1.10	0.15	0.40	0.10

2 结果与分析

2.1 正交试验

运用表 1 中全部 13 个样本对正交试验设计表(表 3) 中 16 个反应体系分别进行测试,经过比较,发现反应体系 6 的 PCR 扩增效果相对较好,条带清晰,非特异性条带较少,因此,将其确定为较合适的反应体系(图 2)。

2.2 单因子试验

为了进一步优化这一反应体系,又运用表 1 中

样本 1、2,采用单因素完全试验设计,同时研究了各因素不同处理水平的影响。

2.2.1 模板 DNA 用量对 SSR-PCR 反应的影响 一般来说,过少的模板 DNA 量会使 PCR 扩增产物少,显带弱,过高的量又会增加非特异性产物,本试验中设计的几种 DNA 用量梯度变化不大(0.5、1.0、1.5 和 2.0 μL),扩增效果差异也不大,都可看到扩增产物,条带亮度由弱变强,所以从经济角度考虑,确定最适 DNA 用量为 1.0 μL (图 3)。

2.2.2 Mg^{2+} 用量对 SSR-PCR 反应的影响 Mg^{2+} 是 *Taq* 酶的激活剂, 一般情况下, 过少的 Mg^{2+} 会降低 *Taq* 酶作用效率, 减少 PCR 扩增产物甚至使 PCR 扩增失败而没有条带, 过量的 Mg^{2+} 会导致酶催化非特异性产物的扩增, 降低 PCR 扩增的特异性。而在本试验设计的范围内, 随着 Mg^{2+} 的用量由少到多 (0.5、0.7、0.9 和 1.1 μL), 梯度变化不大, 扩增条带由弱逐渐变得清晰, 0.7 和 0.9 μL 的效果差别不大, 所以最适 Mg^{2+} 用量确定为 0.7 μL (图 4)。

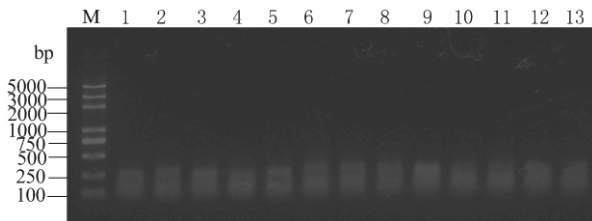


图 2 油茶 SSR-PCR 正交试验设计反应体系 6 琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 SSR-PCR results of system 6 in orthogonal experimental design for *C. oleifera* on agarose gel

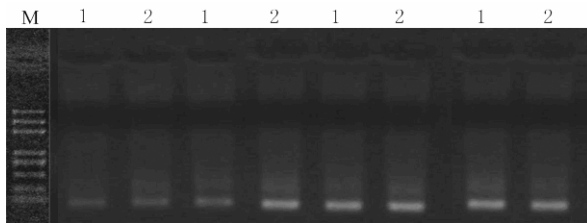


图 3 DNA 用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 3 Effects of DNA concentrations on SSR-PCR

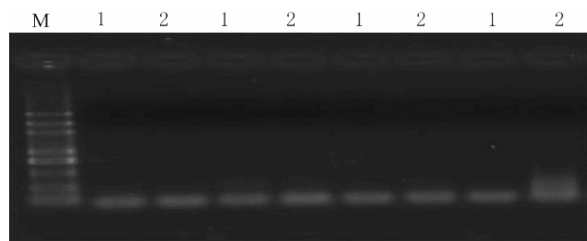


图 4 Mg^{2+} 用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 4 Effects of Mg^{2+} concentrations on SSR-PCR

2.2.3 dNTP 用量对 SSR-PCR 反应的影响 dNTP 是 PCR 反应的原材料, 用量过少时, 扩增效率低, 条带很弱或无扩增产物。本试验中 dNTP 用量为 0.15 μL 时, 扩增效果较好, 有清晰条带, 而用量分别为 0.25 μL 、0.35 μL 、0.45 μL 时, 均出现弥散条带, 可能是因为 dNTP 浓度过高, 能与 Mg^{2+} 结合, 减少了 *Taq* 酶的激活剂, 从而降低了 *Taq* 酶的聚合效率, 导致扩增效率低。因此 dNTP 最适用量确定为 0.15 μL (图 5)。

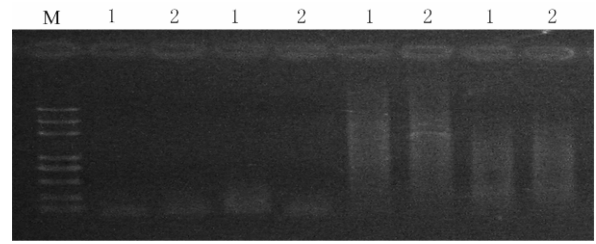


图 5 dNTP 用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 5 Effects of dNTP concentrations on SSR-PCR

2.2.4 引物用量对 SSR-PCR 反应的影响 引物用量过少时, 扩增效率低, 有弥散条带。通过对 4 个引物用量 (0.2、0.3、0.4 和 0.5 μL) 测试发现, 随着引物量增加, 非特异性条带渐增, 还可能产生引物二聚体, 二者又可进一步作为 PCR 反应的底物, 与靶序列竞争 *Taq* 酶和 dNTPs, 从而使靶序列的扩增量降低, 0.2 μL 时, 扩增效果最好, 条带最清晰。所以, 在本试验中, 最适引物用量为 0.2 μL (图 6)。

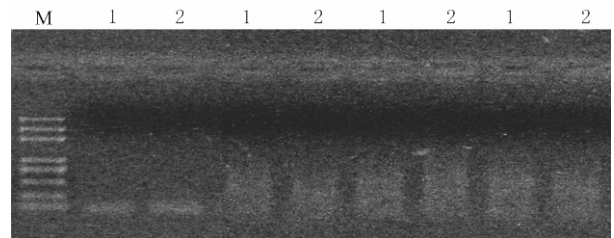


图 6 引物用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 6 Effects of single primer concentrations on SSR-PCR

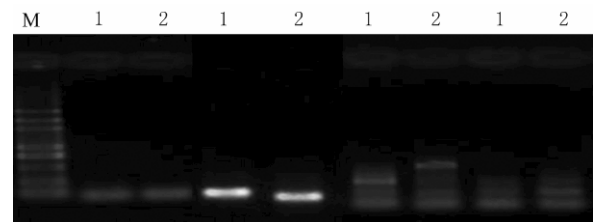


图 7 *Taq* DNA 聚合酶用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 7 Effects of *Taq* polymerase concentrations on SSR-PCR

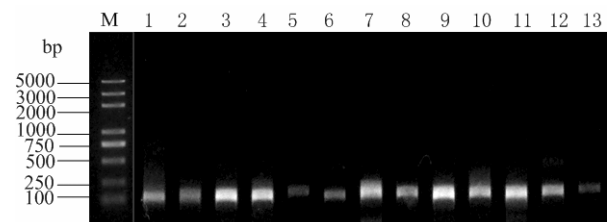


图 8 油茶 SSR-PCR 琼脂糖凝胶电泳

Figure 8 Pattern of SSR-PCR for *C. oleifera* on agarose gel

2.2.5 *Taq* DNA 聚合酶用量对 SSR-PCR 反应的影响 试验中发现, *Taq* DNA 聚合酶用量为 0.05 μL 时,

扩增产物少, 显带弱, 随着用量增加, 达到 0.15 μL 和 0.20 μL 时, 由于错配率增加, 非特异性条带增多, 而在 0.1 μL 时, 扩增效果最好, 显带最清晰, 所以 *Taq* DNA 聚合酶最适用量为 0.1 μL (图 7)。

经过以上反应体系和扩增条件的优化, 确定最适的油茶 SSR-PCR 反应体系为模板 DNA (5~10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1.0 μL , Mg^{2+} (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.7 μL , dNTP (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.15 μL , 正反向引物均为 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.1 μL , 10 \times PCR 缓冲液 1.0 μL , HPLC 水 6.65 μL , 总体积 10.0 μL 。PCR 产物分别经琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 拍照如图 8 和图 9 所示。

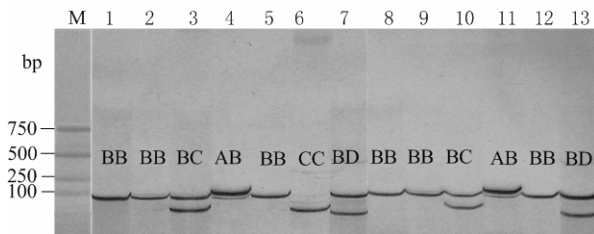


图 9 油茶 SSR-PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Figure 9 Pattern of SSR-PCR for *C. oleifera* on PAAG

3 小结与讨论

SSR-PCR 反应受 DNA 模板、 Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* 酶量等因素的影响。为确定最优反应体系, 有必要找出各水平间的最优组合, 同时, 合适的退火温度也是影响扩增效果的重要因素。不同引物对退火温度的要求也有不同, 本研究只对一种引物的扩增效果进行了测试, 在分别用多种引物扩增时, 还需要对退火温度分别做适当调试。

微卫星标记的优点如多态性高、共显性、检测方法简单以及在近缘种之间的通用性, 在本研究中再次得到了证明。在对 13 个油茶样本的微卫星位点进行扩增后, 发现了 4 个等位谱带(或等位基因: A、B、C、D), 2 种纯合基因型 (BB、CC), 3 种杂合基因型 (AB、BC、BD) (图 9), 在分子水平上揭示了油茶品种的遗传多样性。因此, 微卫星标记在遗传多样性分析、种质鉴定、亲缘关系分析等研究方面, 是一种优异的分子标记, 本研究结果可以为后续遗传学研究奠定重要理论和技术支持。

参考文献:

- [1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucl Acids Res, 1989, 17: 6463-6471.
- [2] Morgante M, Olivieri A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics [J]. Plant J, 1993, 3: 175-182.
- [3] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. Mol Breeding, 1996, 2: 225-238.
- [4] Inghelandt D V, Melchinger A E, Lebreton C, et al. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers [J]. Theor Appl Genet, 2010, 120: 1289-1299.
- [5] Gulsen O, Uzun A, Canan I, et al. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers [J]. Euphytica, 2010, 173: 265-277.
- [6] Zhang L, Brown C R, Culley D, et al. Inferred origin of several native American potatoes from the Pacific Northwest and Southeast Alaska using SSR markers [J]. Euphytica, 2010, 174: 15-29.
- [7] Zhang P, Dreisigacker S, Buerkert A, et al. Genetic diversity and relationships of wheat landraces from Oman investigated with SSR markers [J]. Genet Resour Crop Ev, 2006, 53: 1351-1360.
- [8] Rallo P, Tenzer I, Gessler C, et al. Transferability of olive microsatellite loci across the genus *Olea* [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 940-946.
- [9] Akkac A, Scariot V, Marinoni D T, et al. Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* L. and their transferability to other *Phoenix* species [J]. Biol Plantarum, 2009, 53: 164-166.
- [10] Ma K H, Kim N S, Lee G A, et al. Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum* [J]. Theor Appl Genet, 2009, 119: 1247-1254.
- [11] Kaundun S S, Matsumoto S. Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis* [J]. Genome, 2002, 45: 1041-1048.
- [12] Zhao L P, Liu Z, Chen L, et al. Generation and characterization of 24 novel EST derived microsatellites from tea plant (*Camellia sinensis*) and cross-species amplification in its closely related species and varieties [J]. Conserv Genet, 2008, 9: 1327-1331.
- [13] Sharma R K, Bhardwaj P, Negi R, et al. Identification, characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.) [J/OL]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 53 <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/53>.
- [14] Yang J B, Yang J, Li H T, et al. Isolation and characterization of 15 microsatellite markers from wild tea plant (*Camellia taliensis*) using FIASCO method [J]. Conserv Genet, 2009, 10: 1621-1623.
- [15] 李纪振. 油茶[M]. 北京: 中国农业出版社, 1980.
- [16] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988.
- [17] 黄永芳, 陈锡沐, 庄雪影, 等. 油茶种质资源遗传多样性分析[J]. 林业科学, 2006, 42(4): 38-43.
- [18] 张国武, 钟文斌, 乌云塔娜, 等. 油茶优良无性系 ISSR 分子鉴别[J]. 林业科学研究, 2007, 20(2): 278-282.
- [19] 王保明, 陈永忠, 谭晓风, 等. 应用 ISSR 分析油茶无性系的遗传多样性[J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(6): 19-23.
- [20] 林萍, 姚小华, 王开良, 等. 油茶长林系列优良无性系的 SRAP 分子鉴别及遗传分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(2): 272-279.
- [21] 李铁柱, 田大伦, 乌云塔娜, 等. 四倍体油茶的鉴定及变异[J]. 林业科学, 2009, 45(3): 150-154.