

# 基于 *Adh* 基因家族序列的牡丹组 (Sect. *Moutan* DC.) 种间关系

林启冰<sup>1,2</sup> 周志钦<sup>1,2</sup>\* 赵 宣<sup>1,2</sup> 潘开玉<sup>1</sup> 洪德元<sup>1</sup>\*

(<sup>1</sup> 中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室, 北京 100093; <sup>2</sup> 西南农业大学园艺系, 重庆 400716)

**摘 要:** 测定了牡丹组 7 个种 10 个野生居群共 10 份样品的全部 *Adh1A*、*Adh1B* 和 *Adh2* 基因序列。结合前人已报道的牡丹野生种的 *Adh* 基因序列, 以芍药组 (Sect. *Paeonia*) 和北美芍药组 (Sect. *Oneapia*) 的种作外类群, 用 PAUP \* (4.0 b 4 a) 计算机程序构建了牡丹组全部 8 个种的 *Adh1A*、*Adh1B* 和 *Adh2* 基因树 (最大简约树和邻接树), 同时进行了 *Adh1A*、*Adh1B* 和 *Adh2* 基因序列的合并分析。结果表明, 牡丹组的 8 个种分为两个具有 90 % 以上自展值支持的单系分支, 分别对应 Stern (1946) 根据形态划分的革质花盘亚组 (Subsect. *Vaginatae*) 和肉质花盘亚组 (Subsect. *Delavayanae*)。在革质花盘亚组内, 本研究结果支持银屏牡丹 (*Paeonia suffruticosa* ssp. *yinpingmudan*) 和凤丹 (*P. ostii*)、紫斑牡丹 (*P. rockii*) 和四川牡丹 (*P. decomposita*) 以及矮牡丹 (*P. jishanensis*) 和卵叶牡丹 (*P. qiui*) 各种之间有更近的亲缘关系, 但有关牡丹复合体 (*P. suffruticosa* complex) 内各种间更进一步的关系还有待进一步研究。根据 *Adh* 基因树并结合前人的结果对牡丹组的种间关系进行了详细的讨论。

**关键词:** 芍药属; 牡丹组; *Adh* 基因; DNA 序列; 种间关系

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 05-0627-06

## Interspecific Relationships among the Wild Species of *Paeonia* Sect. *Moutan* DC. Based on DNA Sequences of *Adh* Gene Family

Lin Qibing<sup>1,2</sup>, Zhou Zhiqin<sup>1,2</sup>\*, Zhao Xuan<sup>1,2</sup>, Pan Kaiyu<sup>1</sup>, and Hong Deyuan<sup>1</sup>\*

(<sup>1</sup> Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>2</sup> Department of Horticulture, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Five out of eight species in the *Paeonia* Sect. *Moutan* were suggested to be the wild ancestors of the cultivated tree peonies in China. Therefore, it is of great importance both in theory and practice to have a better understanding of the relationships among the species of *Paeonia* Sect. *Moutan* DC.. In this study, a portion (five exons and four introns) of the alcohol dehydrogenase (ADH) genes including *Adh1A*, *Adh1B*, and *Adh2* of 10 accessions of wild tree peonies collected from ten wild populations representing 7 species of *Paeonia* Section *Moutan* were sequenced and analyzed. Using species in the Section *Paeonia* and Section *Oneapia* as outgroups, both maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) trees of all 8 wild species of *Paeonia* Section *Moutan* for each gene were constructed with PAUP \* (version 4.0 b 4 a) computer program based on the sequences obtained in this study and those downloaded from the Genbank. A combined analysis of *Adh1A*, *Adh1B* and *Adh2* gene sequences was also carried out. Results obtained in this study indicate that eight species of *Paeonia* Section *Moutan* form two strongly supported (bootstrap > 90 %) monophyletic clades which respond to Subsect. *Vaginatae* and Subsect. *Delavayanae* of Stern's system (1946). Within the Subsect. *Vaginatae*, our results support that there are close relationships between *P. suffruticosa* ssp. *yinpingmudan* and *P. ostii*, *P. decomposita* and *P. rockii*, and *P. jishanensis* and *P. qiui*. However, for the general interspecific relationships among the species in *P. suffruticosa* complex, new pieces of evidence are still needed. Based on the gene trees obtained in this study and results reported in previous literature, the

收稿日期: 2003-12-15; 修回日期: 2004-04-02

基金项目: 中国科学院方向性项目 (Kscx2-sw-108); 国家自然科学基金项目 (NSFC30130030)

\*通讯作者 Author for correspondence (hongdy@ns.ibcas.ac.cn, zqzhoubj@yahoo.com)

interspecific relationship of *Paeonia* Section *Moutan* was discussed in details.

**Key words:** *Paeonia*; Section *Moutan*; *Adh* genes; DNA sequences; Interspecific relationship

芍药属 (*Paeonia* L.) 牡丹组是芍药属中唯一的木本类群, 其全部野生种类都产于中国<sup>[1]</sup>。近十几年来, 有关野生牡丹的分类学研究取得了重要的进展<sup>[2~11]</sup>。然而, 在牡丹组种间关系方面却只有一些不完整的研究报道<sup>[12~14]</sup>。近年来, Sang 等<sup>[15~17]</sup>, Ferguson 等<sup>[18]</sup>和 Tank 等<sup>[19]</sup>用 DNA 序列对芍药属的种间关系进行了一系列的研究。最近, Zhou 等<sup>[20]</sup>利用形态学性状, 在居群水平上对洪德元和潘开玉 (1999) 牡丹新分类系统的全部 8 个种进行了系统发育关系分析, 提出了牡丹组种间系统发育关系的框架, 但有关牡丹复合体的几个近缘种间关系仍未得到很好的解决。由于牡丹复合体中的各个近缘种被认为是栽培牡丹的野生祖先<sup>[1,9]</sup>。因此, 弄清牡丹组的种间亲缘关系具有重要的理论和实践价值。

Sang 等<sup>[15~17]</sup>和 Ferguson 等<sup>[18]</sup>的研究结果证明, 利用乙醇脱氢酶基因 (*Adh* genes) 比使用 ITS 和叶绿体 *matK* 基因能建立更好的芍药属种间关系。但他们的研究只涉及牡丹组的 4 个种: 滇牡丹 (*P. delavayi*)、紫斑牡丹 (*P. rockii*)、矮牡丹 (*P. jishanensis*)、四川牡丹 (*P. decomposita*)。因此, 本研究拟在前人工作的基础上, 使用牡丹组全部野生种的 *Adh* 基因序列来分析牡丹组种间亲缘关系, 希望为牡丹组野生种间亲缘关系提供直接的分子证据。

## 1 材料与方法

本研究所用的材料包括牡丹组的全部 8 个野生种, 有关材料来源详见表 1。除了本研究新测定的 *Adh* 基因序列外, 在构建 *Adh* 基因树时还使用了 GenBank 中如下 *Adh* 基因序列: 滇牡丹 (AF009052、AF009058、AF009059、AF009042、AF009051、AF009057), 紫斑牡丹 (AF009045、AF009053、AF009062、AF009063), 矮牡丹 (AF009043、AF009054、AF009060), 四川牡丹 (AF009044、AF009061), 川赤芍 (*P. veitchii*, AF009048、AF009066), 芍药 (*P. lactiflora*, AF009049、AF009068), 加利福尼亚芍药 (*P. californica*, AF009041、AF009056), 北美芍药 (*P. brownii*, AF009055)。

表 1 本研究所用的野生牡丹材料

Table 1 The wild tree peonies used in the present study and their origins (all the vouchers in PE)

材料 Materials	缩写 * Abbreviations	来源 Origin	采集人及采集号 Collectors & No.	筛选克隆 数 Clones screened	测序的克隆 Clones sequenced		
					<i>Adh1A</i>	<i>Adh1B</i>	<i>Adh2</i>
大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i>	LUD124	西藏林芝 Nyingchi, Xizang	S. L. Zhou H02124	75	1	1	2
圆裂四川牡丹 <i>P. decomposita</i> ssp. <i>rotundiloba</i>	ROT16-1	四川茂县 Maoxian, Sichuan	Hong, Pan & Zhou H02016-1	16	2	1	1
紫斑牡丹原亚种 <i>P. rockii</i> ssp. <i>rockii</i>	ROC121	河南宝天曼 Baotianman, Henan	Hong, Ye & Feng H97015	16	1	1	1
太白山紫斑牡丹 <i>P. rockii</i> ssp. <i>taibaishanica</i>	TAI122	陕西太白山 Taibaishan, Shaanxi	Hong, Ye & Feng H97058	12	1	1	1
银屏牡丹巢湖居群 <i>P. suffruticosa</i> ssp. <i>yingpingmu-</i>	YPM117	安徽巢湖 Chaochu, Anhui	Pan & Xie H9701	16	1	2	3
银屏牡丹嵩县居群 <i>P. suffruticosa</i> ssp. <i>yingpingmu-</i>	YPM118	河南嵩县 Songxian, Henan	Hong, Ye & Feng H97010	16	1	1	3
凤丹 <i>P. ostii</i>	OST106	河南卢氏 Lushi, Henan	Hong, Pan & Zhou H02106	16	1	1	2
凤丹 <i>P. ostii</i>	OST78	湖北保康 Baokang, Hubei **	Hong, Pan & Zhou H02078	18	2	2	4
卵叶牡丹 <i>P. qiui</i>	QIU80	湖北保康 Baokang, Hubei **	Hong, Pan & Zhou H02080	12	1	1	3
矮牡丹 <i>P. jishanensis</i>	JIS119	陕西延安 Yan'an, Shaanxi	Hong, Pan & Zhou H97066	16	1	1	2

\* 缩写中的数字代表试验号。\* \* 样品采自甘肃兰州的引种居群。

\* The numbers included in abbreviations represent experiment No. \* \* Samples were collected from the cultivated plants in Lanzhou, Gansu province, China.

基因组 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法<sup>[21]</sup>。基因片段的扩增使用引物<sup>[17]</sup> *AdhF2* (5'-CCTCGCATATTTGGTCACGAAG3') 和 *AdhR2* (5'-GGGCACACCAACAAGTACTG3')，在 Tpersonal PCR 仪 (Biometra 公司) 上进行。Taq DNA 聚合酶为华美公司生产，扩增条件为：94 4 min；94 1 min，56 45 s，72 1 min 30 s (1~5 循环)；94 20 s，55 20 s，72 1 min 30 s (6~36 循环)。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶在 TAE 中电泳检测并回收目标片段。产物回收使用 Amersham Biosciences 公司生产的 PCR 产物回收试剂盒 (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit)，方法按照使用说明进行。纯化后的 PCR 产物用 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System II (Promega 公司) 连接，并转化 JM109 大肠杆菌感受态细胞。在含氨苄青霉素和 X-gal 的 LB 平板上根据蓝白反应筛选阳性克隆。质粒 DNA 提取采用碱裂解法。用 *EcoRI* 酶切和 PCR 方法对质粒 DNA 进行筛选，并将选取的克隆用于测序。测序引物与扩增引物相同，序列测定在 ABI377 全自动测序仪上进行，测序试剂盒为 DNA Sequencing Kit (PE 公司)。序列校正用 SeqED 3.0 程序。

序列的对齐使用 ClustalX 程序<sup>[22]</sup>，对齐后的序列再加以人工检查。基因树的构建用 PAUP \* 4.0b 4a<sup>[23]</sup>。最大简约树 (Maximum parsimony, MP) 的构建使用启发式搜索，树二等分再连接分支交换 (TBR)，各种核苷酸替代同等加权，空位 (gaps) 视为信息缺失 (missing information)。自展检验 (bootstrap analysis) 重复 500 次。邻接树 (Neighbor-joining, NJ) 的构建使用 Kimura 两参数模型 (Kimura 2-parameter)。自展检验 (bootstrap analysis) 重复 1000 次。*Adh1A*、*Adh1B*、*Adh2* 基因树的拓扑结构一致性用 PAUP \* 4.0b 4a 中的 partition homogeneity test 来进行评价<sup>[24]</sup>。运算 1000 次，用得到的 P 值来决定是否将数据合并以进行系统发育分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生牡丹 *Adh* 基因序列的信息参数

本研究测定的 *Adh1A*、*Adh1B*、*Adh2* 基因序列包括 4 个内含子和 5 个外显子。从表 2 中可以看出，信息位点占序列的排列长度的百分率是比较高的，比芍药组的 *mat K* 基因的变异率 (0.85%) 和 ITS 区的变异率 (3.11%) 都要高；和芍药组的 *Adh* 基因的内含子的变异率相比，牡丹的 *Adh1A* 信息位点百分率 (4%) 比芍药组的 *Adh1* 内含子变异率 (4.68%) 略低，但牡丹的 *Adh2* 信息位点百分率 (7%) 却比芍药组的 *Adh2* 内含子变异率 (4.54%) 高得多<sup>[25]</sup>。

表 2 *Adh* 基因的信息参数

Table 2 Informative parameters for *Adh* gene sequences

数据 Data	排列 长度 Aligned length	变异 位点 Variable sites	信息位点 Informative sites	信息位点 百分率 Informative sites (%)	树长 Tree length	CI	RI	GC (%)
<i>Adh1A</i> 1156	169	50	4	4	200	0.92	0.83	39.79
<i>Adh1B</i> 1172	130	50	4	4	153	0.90	0.86	39.44
<i>Adh2</i> 1174	301	87	7	7	381	0.87	0.82	40.73

### 2.2 野生牡丹的 *Adh* 基因树

#### 2.2.1 *Adh1A*、*Adh1B* 和 *Adh2* 基因树 对 *Adh1A*、*Adh1B* 和 *Adh2* 基因的建树分析 (其中 *Adh1B* 基因树

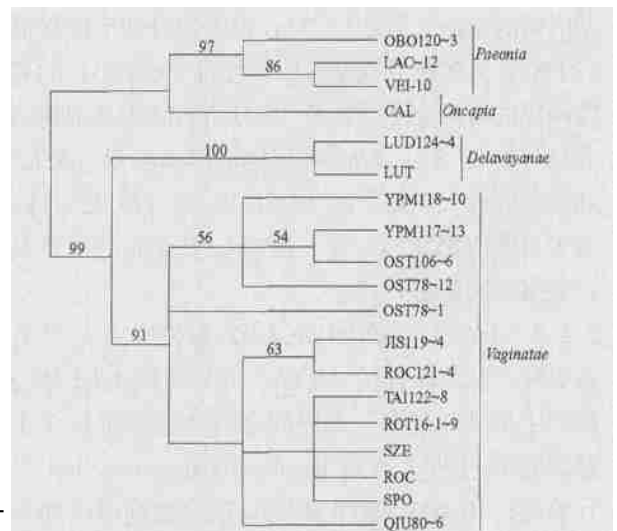


图 1 *Adh1A* 基因的 2 棵最简约树的严格一致树

树长 = 200; CI = 0.9150; RI = 0.8265,

分支上的数值代表大于 50% 的自展支持率，

“~” 以后的数字代表克隆号，下同。

Fig. 1 The strict consensus tree of 2 maximum parsimony (MP) trees of *Adh1A* gene

Tree length = 200; Consistency index = 0.9150;

Retention index = 0.8265

The figures above branches are bootstrap percentages above 50%. The figures after ‘~’ represents the clone number, the same below.

用大花黄牡丹 (*P. ludlowii*) 和滇牡丹的克隆置根) 分别得到 2 棵、117 棵和 169 棵最大简约树, 其相应的严格一致树分别见图 1、图 2 和图 3。由于各基因的邻接树 (因篇幅所限未列出) 与其相应的严格一致树所支持的种间关系一致, 我们这里根据各基因的严格一致树来进行种间关系分析: 在 *Adh1A* 和 *Adh2* 基因树上, 牡丹组全部种类的克隆构成具有大于 99 % 的自展值支持的一支 (图 1 和图 3)。在牡丹组内, 在 *Adh1A* 和 *Adh2* 基因树上大花黄牡丹 (LUD124) 和滇牡丹 (LUT) 的克隆聚成一单系分支 (自展值 > 92 %) (图 1 和图 3), 但在 *Adh1B* 基因树 (图 2) 上, 大花黄牡丹的克隆 (LUD124 ~ 29) 未与滇牡丹 (DEL、LUT) 的克隆聚在一起, 而是与圆裂四川牡丹的一个克隆 (ROT16-1 ~ 3) 相聚 (自展值为 100 %); 在 *Adh1A* 和 *Adh1B* 基因树上, 代表其余 6 个种的全部克隆构成另一个单系分支 (自展值 > 91 %) (图 1 和图 2), 在 *Adh2* 基因树上, 情况稍微复杂一点 (图 3)。然而, 在此 6 个种的克隆构成的分支中, 银屏牡丹巢湖居群 (YPM117) 的克隆和凤丹 (OST106、OST78) 的克隆构成的分支得到了 3 个基因树的支持 (图 1 ~ 3); 银屏牡丹的河南居群 (YPM118) 的部分克隆和卵叶牡丹 (QIU80) 的克隆构成的单系分支得到了 *Adh1B* 和 *Adh2* 基因树的支持 (图 2、3); *Adh2* 基因树上四川牡丹 (SZE) 和紫斑牡丹 (ROC ~ 1、ROC121 ~ 5、TAI122 ~ 11) 聚为自展值 85 % 的一支 (图 3)。其余各分支及其自展值详细见图 1 ~ 3。

**2.2.2 *Adh1A*、*Adh1B* 和 *Adh2* 基因合并分析的基因树** 从每个样的 *Adh1A*、*Adh1B* 和 *Adh2* 基因序列中分别任意选一条序列来代表该样进行 3 个基因合并分析。通过 partition-homogeneity test<sup>[24]</sup> 计算得  $P = 0.001$ 。现有研究对确定数据间不冲突的  $P$  值范围有争议<sup>[26]</sup>, 而本研究的  $P$  值 ( $P = 0.001$ ) 处于其争议的  $P$  值范围下限, 鉴于此, 我们用合并的数据进行了简约性分析, 树置根处理同 *Adh1B* 基因树。结果得到了唯一一棵 MP 树 (图 4)。根据图 4, 所有的分支均得到了大于 85 % 的自展值支持。和 *Adh1A*、*Adh1B*、*Adh2* 基因树一致, 合并分析的 MP 树支持银屏牡丹巢湖居群 (YPM117) 与凤丹 (OST78、OST106) 聚在一起; 与 *Adh1A* 和 *Adh2* 基因树一致, 合并分析的 MP 树支持大花黄牡丹 (LUD124) 和滇牡丹 (此为黄牡丹 LUT) 聚在一起; 与 *Adh2* 基因树一

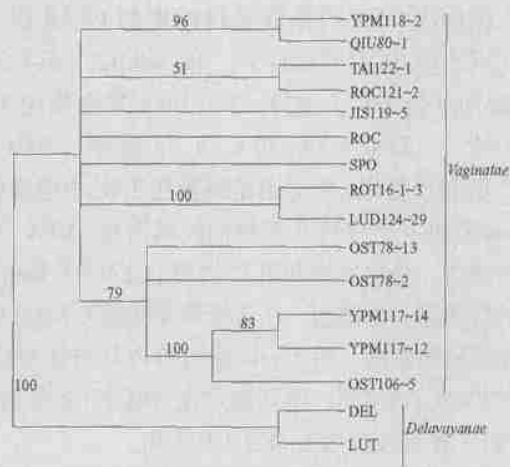


图 2 *Adh1B* 基因的 117 棵最简约树的严格一致树  
树长 = 153; CI = 0.9020; RI = 0.8624

Fig. 2 The strict consensus tree of 117 maximum parsimony (MP) trees of *Adh1B* gene  
Tree length = 153; Consistency index = 0.9020;  
Retention index = 0.8624

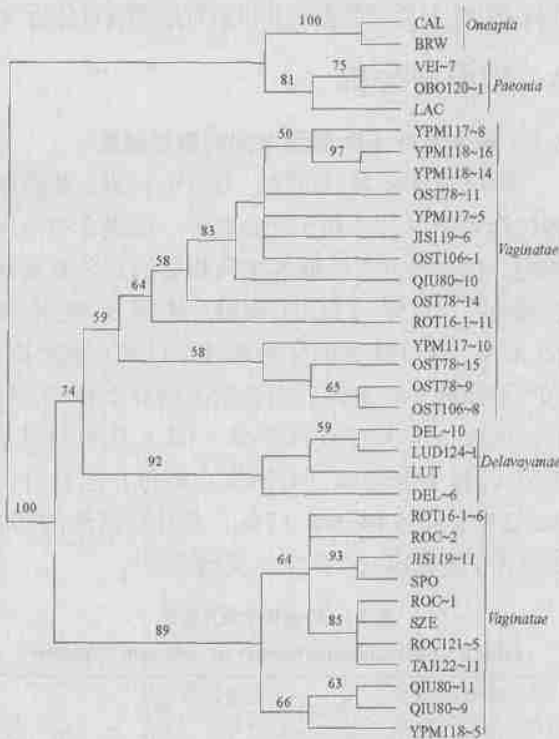


图 3 *Adh2* 基因的 169 棵最简约树的严格一致树  
树长 = 381; CI = 0.8688; RI = 0.8239

Fig. 3 The strict consensus tree of 169 maximum parsimony (MP) trees of *Adh2* gene  
Tree length = 381; Consistency index = 0.8688; Retention index = 0.8239

致, 合并分析的 MP 树支持四川牡丹 (此为圆裂四川牡丹 ROT16-1) 和紫斑牡丹 (ROC121、TAH122、ROC) 聚在一起; 和 *Adh1B*、*Adh2* 基因树一致, 合并分析的 MP 树支持卵叶牡丹 (QIU80) 和银屏牡丹嵩县居群 (YPM118) 聚在一起。与 3 个单独的基因树不同的是, 矮牡丹 (JIS119) 和卵叶牡丹 (QIU80) 及银屏牡丹嵩县居群 (YPM118) 聚在一起并得到了很强支持 (自展值为 94 %)。

### 3 讨论

#### 3.1 *Adh* 基因树的分辨率

从 2.1 的分析来看, 牡丹组 *Adh* 基因家族的 3 个基因的变异率不算低, 但是得到的基因树分辨率不高, 主要表现在 3 个基因的基因树 (图 1~3) 都发生了同种不同克隆未聚为一支的情况。用 *Adh* 基因进行系统发育分析时, Sang 等<sup>[17]</sup>和 Small 等<sup>[27]</sup>也遇到了类似的情况。Sang<sup>[25]</sup>针对这种现象, 总结了可能的原因有基因转换 (gene conversion)、谱系分选 (lineage sorting) 和基因的并系同源 (paralogy) 等。

#### 3.2 牡丹组的种间亲缘关系

洪德元和潘开玉的牡丹分类系统将牡丹组分为大花黄牡丹, 滇牡丹, 四川牡丹, 紫斑牡丹, 矮牡丹, 凤丹, 卵叶牡丹, 和牡丹 (*P. suffruticosa*) 共 8 种; 大花黄牡丹, 滇牡丹属于肉质花盘亚组, 其余 6 个种属于革质花盘亚组<sup>[5]</sup>。

对于这些种间的亲缘关系, 前人的一系列研究, 如于玲等的蛋白质证据<sup>[13]</sup>、邹喻苹等的 RAPD 证据<sup>[12]</sup>、Sang 等的 *Adh* 基因序列<sup>[17]</sup>、Tank 等的 GPAT 基因序列<sup>[19]</sup>、Zhou 等的形态证据<sup>[20]</sup>, 都一致支持滇牡丹和大花黄牡丹关系最近。本文的研究结果与上述结果完全一致 (图 1、3 和 4)。

在牡丹复合体 (紫斑牡丹, 矮牡丹, 凤丹, 卵叶牡丹, 和牡丹) 内, 各种间在形态学和细胞学方面都具有非常近的亲缘关系<sup>[28,6]</sup>。有关复合体内各种间关系以及这些种与四川牡丹之间的关系, 在现有的研究报道中没有一致的结论<sup>[29]</sup>。裴颜龙等认为卵叶牡丹和矮牡丹亲缘关系接近<sup>[11]</sup>。同时, 洪涛等认为凤丹、紫斑牡丹、矮牡丹之间亲缘关系也非常近<sup>[10]</sup>。袁涛和王莲英利用形态和孢粉学特征进行的分析支持上述种类中卵叶牡丹与矮牡丹亲缘关系最近, 它们与其余种的远近关系依次为杨山牡丹 (凤丹) 和紫斑牡丹<sup>[14]</sup>。但他们的结论与邹喻苹等<sup>[12]</sup>的 RAPD 证据并不完全一致。根据本文的研究结果, 合并分析的基因树 (图 4) 显示卵叶牡丹和矮牡丹之间有近的种间关系, 这一点与前人的研究结果一致。从 *Adh* 基因树上, 可以明显地看到银屏牡丹嵩县居群和凤丹有更近的种间关系 (图 1~4), 同时, 这两个种中的银屏牡丹嵩县居群和卵叶牡丹有一定的关系 (图 2~4)。这些结果是前人的研究中没有报道的。另外, 在形态学上, 四川牡丹表现了从大花黄牡丹和滇牡丹向牡丹复合体过渡的中间形态。袁涛和王莲英<sup>[14]</sup>以及 Zhou 等<sup>[20]</sup>的形态证据和众多的分子证据<sup>[12,13,17,19]</sup>支持四川牡丹与紫斑牡丹有很近的亲缘关系。本文的研究结果中, *Adh2* 和合并分析的基因树也明显支持这种关系 (图 3、4)。同时, 在 *Adh1B* 基因树上, 圆裂四川牡丹与大花黄牡丹聚在一起并得到 100 % 自展值的支持, 这是否暗示四川牡丹和肉质花盘亚组两个种间的亲缘关系, 值得进一步研究 (图 2)。

综合上述讨论, 可以得出: 本研究支持滇牡丹和大花黄牡丹、四川牡丹和紫斑牡丹、银屏牡丹

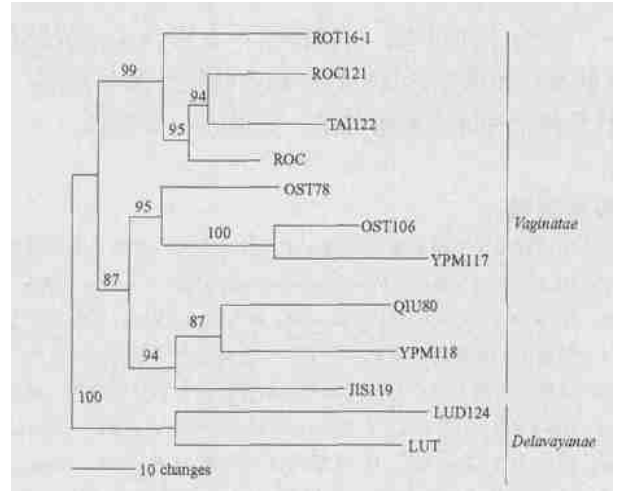


图 4 合并 *Adh1A*、*Adh1B*、*Adh2* 基因序列后得到唯一的 MP 树

树长 = 352; CI = 0.8778; RI = 0.7226

Fig. 4 The single maximum parsimony (MP) tree based on combined *Adh1A*, *Adh1B* and *Adh2* data sets  
Tree length = 352; Consistency index = 0.8778;  
Retention index = 0.7226

(巢湖) 和凤丹以及矮牡丹和卵叶牡丹关系紧密; 另外, 本文结果是否暗示银屏牡丹 (嵩县) 和卵叶牡丹两个种间有紧密关系, 值得进一步探索。

### 参考文献:

- 1 中国牡丹全书编纂委员会编. 中国牡丹全书. 北京: 中国科学技术出版社, 2002. 1~310
- 2 Hong D Y. Notes on *Paeonia decomposita* Hand. - Mazz. Kew Bulletin, 1997, 52 (4): 957~963
- 3 Hong D Y. *Paeonia* (Paeoniaceae) in Xizang (Tibet). Novon, 1997, 7: 156~161
- 4 洪德元. 紫斑牡丹及其一新亚种. 植物分类学报, 1998, 36 (6): 538~543
- 5 洪德元, 潘开玉. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理. 植物分类学报, 1999, 37 (4): 351~368
- 6 Hong D Y, Pan K Y. A revision of the *Paeonia suffruticosa* complex (Paeoniaceae). Nord. J. Bot., 1999, 19 (3): 289~299
- 7 Hong D Y, Pan K Y, Pei Y L. The identity of *Paeonia decomposita* Hand. - Mazz. Taxon, 1996, 45: 67~69
- 8 Hong D Y, Pan K Y, Yu H. Taxonomy of the *Paeonia delavayi* complex (Paeoniaceae). Ann. Missouri Bot. Gard., 1998, 85: 554~564
- 9 洪德元, 潘开玉, 谢中稳. 银屏牡丹——花王牡丹的野生近亲. 植物分类学报, 1998, 36 (6): 515~520
- 10 洪 涛, 张家勋, 李嘉珏, 等. 中国野生牡丹研究 (一) 芍药属牡丹组新分类群. 植物研究, 1992, 12 (3): 223~234
- 11 裴颜龙, 洪德元. 卵叶牡丹——芍药属一新种. 植物分类学报, 1995, 33 (1): 91~93
- 12 邹喻苹, 蔡美琳, 王子平. 芍药属牡丹组的系统学研究——基于 RAPD 分析. 植物分类学报, 1999, 37 (3): 220~227
- 13 于 玲, 何丽霞, 李嘉珏, 等. 牡丹野生种间蛋白质谱带的比较研究. 园艺学报, 1998, 25 (1): 99~101
- 14 袁 涛, 王莲英. 几个牡丹野生种的花粉形态及其演化、分类的探讨. 北京林业大学学报, 1999, 21 (1): 17~21
- 15 Sang T, Crawford DJ, Stuessy T F. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92 (15): 6813~6817
- 16 Sang T, Crawford DJ, Stuessy T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). Am. J. Bot., 1997, 84 (8): 1120~1136
- 17 Sang T, Donoghue MJ, Zhang D. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in peonies (*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrid species. Mol. Biol. Evol., 1997, 14 (10): 994~1007
- 18 Ferguson D, Sang T. Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies (*Paeonia*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98 (7): 3915~3919
- 19 Tank D C, Sang T. Phylogenetic utility of the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene: evolution and implications in *Paeonia* (Paeoniaceae). Mol. Phylogenet. Evol., 2001, 19 (3): 421~429
- 20 Zhou Z Q, Pan K Y, Hong D Y. Phylogenetic analysis of *Paeonia* section *Moutan* (tree peonies, Paeoniaceae) based on morphological data. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2003, 41 (5): 436~446
- 21 Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull., 1987, 19: 11~15
- 22 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876~4882
- 23 Swofford D L. PAUP \*4.0b4a: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*, and other methods). Sunderland: Sinauer, Associates, 2000
- 24 Johnson L A, Soltis D E. Assessing congruence: Empirical examples from molecular data. In: Soltis D E, Soltis P S, Doyle J J. Molecular Systematics Plants. Boston: Kluwer Academy Publications, 1998. 1~42
- 25 Sang T. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 37 (3): 121~147
- 26 Cunningham W C. Can three incongruence tests predict when data should be combined? Mol. Biol. Evol., 1997, 14 (7): 733~740
- 27 Small R L, Wendel J F. Phylogeny, duplication, and intraspecific variation of *Adh* sequences in new world diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae). Mol. Phylogenet. Evol., 2000, 16 (1): 73~84
- 28 洪德元, 张志宪, 朱相云. 芍药属的研究 (1)——国产几个野生种核型的报道. 植物分类学报, 1988, 26 (1): 33~43
- 29 周志钦, 潘开玉, 洪德元. 牡丹组野生种间亲缘关系和栽培牡丹起源研究进展. 园艺学报, 2003, 30 (6): 751~757