

牡丹 89 个不同种源品种遗传多样性和亲缘关系分析

石颜通¹, 周波^{1,2,*}, 张秀新^{1,**}, 江海东², 薛璟祺¹, 王顺利¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 利用 ISSR 分子标记技术, 从 121 条 ISSR 备选引物中筛选出条带清晰、多态性好的 19 条引物对 89 个牡丹品种的遗传多样性进行了分析。通过优化 PCR 试验条件, 共获得 188 条带, 其中 177 条表现出多态性, 多态位点的百分率为 94.1%。通过计算机软件分析, 供试牡丹品种平均有效等位基因数为 1.514, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.3085, 平均 Shannon's 信息指数为 0.4713; 各品种间的相似系数介于 0.3294 ~ 0.7744 之间, 平均为 0.5722。利用 UPGMA 法作图, 供试的 89 个品种可聚为 2 个类群, 很好地将不同来源的品种区分开来。

关键词: 牡丹; ISSR; 聚类分析; 遗传关系

中图分类号: S 685.11

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 12-2499-08

Assessment of Genetic Diversity and Relationship of 89 Tree Peony Cultivars from Different Provenances

SHI Yan-tong¹, ZHOU Bo^{1,2,*}, ZHANG Xiu-xin^{1,**}, JIANG Hai-dong², XUE Jing-qi¹, and WANG Shun-li¹

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ²College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this paper, ISSR-PCR was used to detect the genetic diversity of these peony cultivars. Nineteen good ISSR primers selected from 122 primers were used to amplify the genomic DNA of some introduced peony cultivars to study on their genetic diversity. The results showed that 188 bands were detected, of which 177 were polymorphic with the polymorphism frequency of 94.1%. Analyzing these results by POPGENE and NTSYS, it was found that the average value of effective allele number, Nei's gene diversity and Shannon's information index of the detected peony cultivars were 1.514, 0.3085 and 0.4713, respectively, and the similarity coefficient were ranged from 0.3294 to 0.7744. The 89 tree peony cultivars could be separated into 2 groups by UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) analysis. The results also provide references for the peony genetic breeding.

Key words: *Paeonia suffruticosa* Andr.; ISSR; cluster analysis; genetic relationship

收稿日期: 2012-07-31; 修回日期: 2012-11-27

基金项目: 国家“863”计划项目 (2011AA10020703); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhxiuxin@163.com)

致谢: 感谢河南省国际牡丹园张淑玲工程师提供本文中所研究的品种材料与品种鉴定, 感谢中国科学院王亮生博士、刘政安博士对本文所研究品种的外文名称的审核与校正。

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 属于芍药属 (*Paeonia* L.) 牡丹组 (sect. *Moutan* DC.), 是中国特有的资源 (洪德元和潘开玉, 1999), 世界各地种植的牡丹 (*P. suffruticosa*) 均直接或间接的引种自中国 (林启冰 等, 2004; 赵宣 等, 2004; 刘萍 等, 2006)。目前世界各地已经形成了各具特色的牡丹品种群, 如欧美牡丹品种群、日本牡丹品种群等 (李嘉珏, 1999)。

目前牡丹育种工作还是以人工定向杂交选择为主。中国牡丹品种多样, 再加上从日本、欧美等国家引入的优良品种, 为牡丹育种工作提供了便利。但现有国内牡丹品种大多亲缘关系不清, 且多为近源品种, 遗传背景相近, 存在育种工作效率低下, 品种出新率低的问题。因此, 牡丹组内远缘杂交已成为种质资源创新的一个重要方向 (关坤, 2009)。明确不同牡丹品种, 尤其是国内与国外品种之间的遗传多样性, 了解其亲缘关系, 成为了牡丹育种工作中的重要研究内容, 相关结果可为牡丹育种提供极大便利。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 已广泛应用于遗传多样性分析、品种鉴定、进化及分子生态学研究 (王建波, 2002)。在牡丹方面, 已有相关研究系统筛选了特异性好的引物 (索志立, 2006), 并利用该技术对牡丹杂交后代进行了快速鉴定 (吴蕊 等, 2011)。因此, ISSR 分子标记在牡丹方面的应用已较为成熟, 可以利用该技术研究不同来源的牡丹品种遗传多样性。

本课题组前期的研究结果 (周波 等, 2011) 表明国外牡丹品种与国内品种在形态特征上有较大差异。本试验中在形态研究的基础上, 对 89 个不同来源的牡丹品种采用 ISSR 分子标记的方法进一步分析遗传多样性, 并与形态多样性研究结果进行对比, 以期为新引进品种在牡丹种质资源的高效利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2009 年 3 月至 2011 年 8 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所完成。试材为 89 个不同来源的牡丹品种, 包括 68 个国外品种和 21 个国内品种 (表 1), 均种植在中国农业科学院蔬菜花卉研究所内牡丹资源圃 (北京)。于 2010 年花期选取生长状态良好、开花正常的植株进行标记, 并于 2011 年春季采集幼叶, 经液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱备用。

1.2 DNA 提取与检测

叶片基因组 DNA 提取方法采用本实验室改良的 CTAB 法 (邹喻苹 等, 2001), 提取得到的 DNA 分别经 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 (Brim-IOA-0004) 检测其质量和浓度后, 将所有品种的 DNA 浓度稀释至 $10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 用于后续试验。

1.3 引物筛选及 PCR 反应优化

根据文献报道及加拿大温哥华哥伦比亚大学 ISSR 引物库数据, 本研究中共合成 ISSR 引物 121 条 (索志立, 2006), 利用 5 个表型差异较大的品种进行引物筛选, 共获得多态性好且条带清晰的引物 19 条, 然后利用这 19 条引物进行后续试验。PCR 反应于 PTC-200 型 PCR 仪上进行 (Bio-Rad), 针对不同引物分别设定相应 PCR 条件。反应体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 5 min; 接着进行如下 3 个程序 (1) 变性: 94°C 1 min, (2) 退火: $45\sim 57^{\circ}\text{C}$ (根据各 ISSR 引物的退火温度) 30 s, (3) 延伸: 72°C 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 8 min。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶分离后用 GoldViewTM 染料染色, Gel-2000 凝胶成像系统 (BIO-RAD) 观察、记录、保存图像。

表 1 89 个牡丹品种及来源

Table 1 The 89 tree peony cultivars and there exporting countries

来源 Origin	编号 No.	品种 Cultivar	来源 Origin	编号 No.	品种 Cultivar	来源 Origin	编号 No.	品种 Cultivar
日本 Japan	1	花王 Kaoh	日本 Japan	31	群乌 Muregarasu	法国 France	61	新桃园 Shintoen
日本 Japan	2	芳纪 Hohki	日本 Japan	32	长寿乐 Chohjuraku	法国 France	62	金阁 Souvenir de Maxime Cornu
日本 Japan	3	日向 Hyuhga	日本 Japan	33	花大臣 Hana Daijin	法国 France	63	金阳 La Lorraine
日本 Japan	4	新七福神 Shin Shichifukujin	日本 Japan	34	黑龙锦 Kokuryu Nishiki	法国 France	64	海黄 High Noon
日本 Japan	5	神乐狮子 Kagura Jishi	日本 Japan	35	八千代椿 Yachiyotsubaki	美国 America	65	瑞龙 Renown
日本 Japan	6	太阳 Taiyoh	日本 Japan	36	锦岛 Nishiki Jima	美国 America	66	中国龙 Chinese Dragon
日本 Japan	7	旭港 Asahi-minato	日本 Japan	37	紫云殿 Hiunden	美国 America	67	盛宴 Banquet
日本 Japan	8	天衣 Ten I	日本 Japan	38	花兢 Hanakisoi	美国 America	68	黑海盜 Black Pirate
日本 Japan	9	岛锦 Shima Nishiki	日本 Japan	39	寒樱狮子 Kanzakura Jishi	中国 China	69	朝阳红 Changyanghong
日本 Japan	10	明石泻 Akashigata	日本 Japan	40	户川寒 Togawakan	中国 China	70	红姝女 Hongshunü
日本 Japan	11	日幕 Higurashi	日本 Japan	41	七宝殿 Shichihohden	中国 China	71	冰凌罩红石 Binglingzhao Hongshi
日本 Japan	12	佛前水 Butsuzen no Mizu	日本 Japan	42	新扶桑 Shin Fuso	中国 China	72	玉面桃花 Yumian Taohua
日本 Japan	13	日月锦 Jitsugetsu Nishiki	日本 Japan	43	御国之旗 Mikuni no Hada	中国 China	73	雪莲 Xuelian
日本 Japan	14	白峰 Shira Mine	日本 Japan	44	麟凤 Rinpoh	中国 China	74	墨楼争辉 Molou Zhenghui
日本 Japan	15	时雨云 Shiguregumo	日本 Japan	45	大正之光 Taisyoh no Hikari	中国 China	75	玉板白 Yubanbai
日本 Japan	16	镰田锦 Kamata Nishiki	日本 Japan	46	春日山 Kasugayama	中国 China	76	紫二乔 Zi'erqiao
日本 Japan	17	岛大臣 Shimadaijin	日本 Japan	47	世世之誉 Yoyono Homare	中国 China	77	珠光墨润 Zhuguang Morun
日本 Japan	18	皇嘉门 Kohka Mon	日本 Japan	48	新日月 Shin Jitsugetu	中国 China	78	乌龙捧盛 Wulong Pengsheng
日本 Japan	19	连鹤 Renkaku	日本 Japan	49	黑道格拉斯 Black Douglas	中国 China	79	景玉 Jingyu
日本 Japan	20	五大洲 Godaishu	日本 Japan	50	黑光司 Kokkoh no Tsukasa	中国 China	80	绽绿 Zhanlü
日本 Japan	21	白妙 Shirotae	日本 Japan	51	紫红殿 Shikoh Den	中国 China	81	丁香紫 Dingxiangzi
日本 Japan	22	初乌 Hatsugarasu	日本 Japan	52	花园珍宝 Garden Treasure	中国 China	82	清香白玉翠 Qingxiang Baiyucui
日本 Japan	23	翁狮子 Okina Jishi	日本 Japan	53	宣阳门 Senyoh Mon	中国 China	83	冰壶献玉 Binghu Xianyu
日本 Japan	24	越之雪 Koshi no Yuki	日本 Japan	54	白雁 Hakugan	中国 China	84	银红巧对 Yinhong Qiaodui
日本 Japan	25	白神 Hakushin	日本 Japan	55	玉帘 Tamasudare	中国 China	85	紫罗兰 Ziluolan
日本 Japan	26	白王狮子 Hakuojishi	日本 Japan	56	大藤锦 Ohfuji Nishiki	中国 China	86	冰罩蓝玉 Bingzhao Lanyu
日本 Japan	27	杨贵妃 Yohkihi	日本 Japan	57	铜云 Dohun	中国 China	87	乌金耀辉 Wujin Yaohui
日本 Japan	28	八束狮子 Yatsukajishi	日本 Japan	58	大杯 Taihai	中国 China	88	豆绿 Doulü
日本 Japan	29	岛乃藤 Shima no Fuji	日本 Japan	59	吉野川 Yoshinogawa	中国 China	89	藏枝红 Cangzhihong
日本 Japan	30	新国色 Shkokushoku	法国 France	60	金鸚 Chromatella			

1.4 数据统计分析

按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE1.32 (Yeh et al., 1997) 软件计算多态位点百分率 (*PPB*)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's (1973) 基因多样性指数 (*H*)、Shannon's 信息指数 (*I*)。用 NTSYS 2.10 版软件中的 DICE 法计算样品间的相似系数,然后利用 SAHN Clustering 进行不加权成对算术平均法 (Unweighted pair-group method arithmetic average, UPGMA) 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 牡丹品种 ISSR 分子标记的多态性

19 条引物共扩增出位点 188 个,其中多态性位点 177 个,多态位点百分率 (*PPB*) 达到了 94.1%。多态位点百分率最低的为引物 854,其值为 77.8%。单条扩增条带数为 8~12 条,平均为 9.9 条 (表 2)。扩增片段大小大多介于 300~1 800 bp 之间。图 1 为引物 836 对 89 个品种的扩增结果。

利用软件包 POPGENE 32 计算各位点的有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多态性指数 (*H*) 以及 Shannon's 信息指数 (*I*),结果表明,供试牡丹品种平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.5140,平均 Nei's 基因多样性指数为 0.3085,平均 Shannon's 信息指数为 0.4713。各位点遗传多样性程度也存在较大差别,Nei's 基因多样性指数最大值为 0.5012,最小值为 0.104,平均值为 0.3085。Shannon's 信息指数最大值为 0.6931,最小值为 0.2237,平均 Shannon's 指数为 0.4713。

表 2 ISSR 分析所用引物序列及其扩增结果
Table 2 The primers and analysis of ISSR amplified results

引物 Primer	引物序列 Sequence of primer	扩增条带数 Number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic	多态位点百分率/% The polymorphism frequency
807	(AG)8T	9	8	88.9
823	(TC)8C	11	10	90.9
824	(TC)8G	8	7	87.5
835	(AG)8YC	12	12	100.0
836	(AG)8YA	11	11	100.0
853	(TC)8RT	8	8	100.0
854	(TC)8RG	9	7	77.8
855	(AC)8YT	10	10	100.0
856	(AC)8YA	11	10	90.9
866	(CTC)6	10	9	90.0
868	(GAA)6	9	9	100.0
895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	11	10	90.9
899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	11	11	100.0
S3	GGAGAA(GCA)4GC	11	10	90.9
S5	(AGTG)4	9	8	88.9
S8	(CT)8RG	9	9	100.0
S9	(CTC)4RC	10	10	100.0
S10	(GA)8T	10	9	90.0
S11	(GA)8C	9	9	100.0
平均 Average		9.9	9.3	94.1
合计 Total		188	177	

注: Y 代表简并碱基 (C 或者 T), R 代表简并碱基 (A 或者 G)。
Note: Y represents degenerate base (C or T), and R represents degenerate base (A or G) .

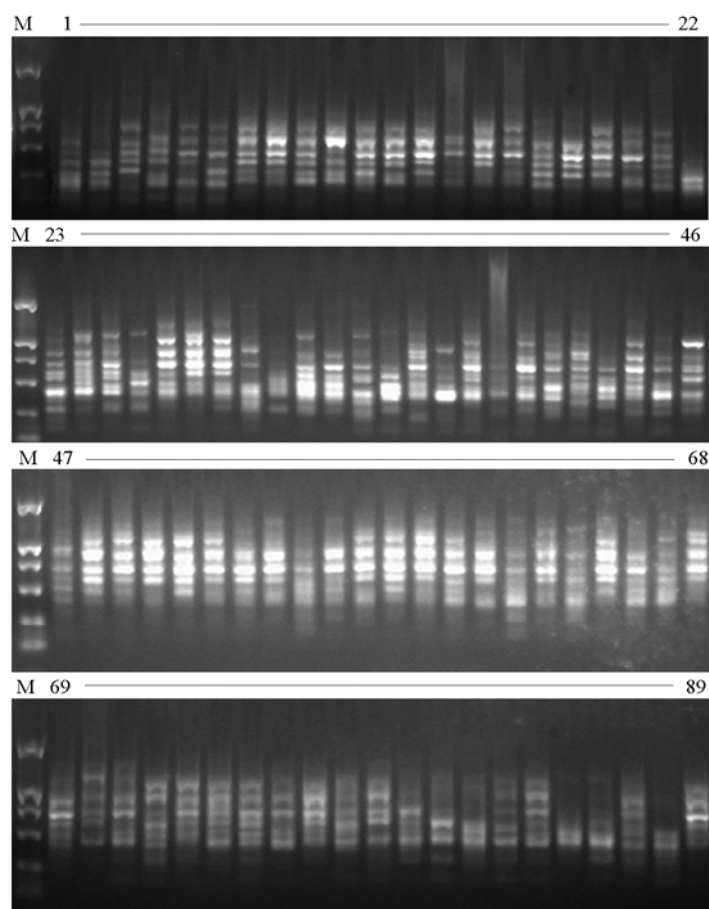


图 1 引物 836 在 89 个牡丹品种中的扩增结果

数字代表不同的牡丹品种。

Fig. 1 ISSR profiles amplified of 89 tree peony cultivars by primer 836

The numbers represent different tree peony cultivars.

2.2 基于相似系数的供试牡丹品种 UPGMA 聚类分析

以供试牡丹品种和 188 个位点的谱带数据位原始矩阵, 共获得 4 278 个两两不同品种间的遗传相似系数。其中在所有品种中相似系数最大的是‘朝阳红’与‘玉面桃花’, 为 0.7744, 说明这两个品种之间的亲缘关系很近。相似系数最小的是‘藏枝红’与‘花兢’, 为 0.3294, 说明二者亲缘关系较远。所有材料的相似系数介于 0.3294~0.7744 之间, 平均为 0.5722。从聚类图上可以看出, 以 0.53 为阈值可以把供试牡丹品种分为两大类群 (图 2)。

第 I 大类: 66 个品种, 包括 57 个日本品种 (占有日本品种的 96.61%), 4 个美国品种, 2 个法国品种和 3 个国内品种。进一步分析又可将第 I 大类为两个亚类 (第 1 亚类和第 2 亚类)。

第 1 亚类有 9 个品种, 包括 4 个美国品种 (占供试美国牡丹品种的 80%), 4 个日本品种和 1 个国内品种。第 2 亚类有 57 个品种, 包括 52 个日本品种 (占供试日本品种的 88.13%), 2 个法国品种 (占供试法国品种的 50%), 2 个中国品种和 1 个美国品种。

第 II 大类有 23 个品种, 包括 18 个国内品种 (占有国内品种的 85.71%), 3 个日本品种和 2 个法国品种。进一步分析又可将第 II 大类分为 2 个亚类 (第 3 亚类和第 4 亚类)。

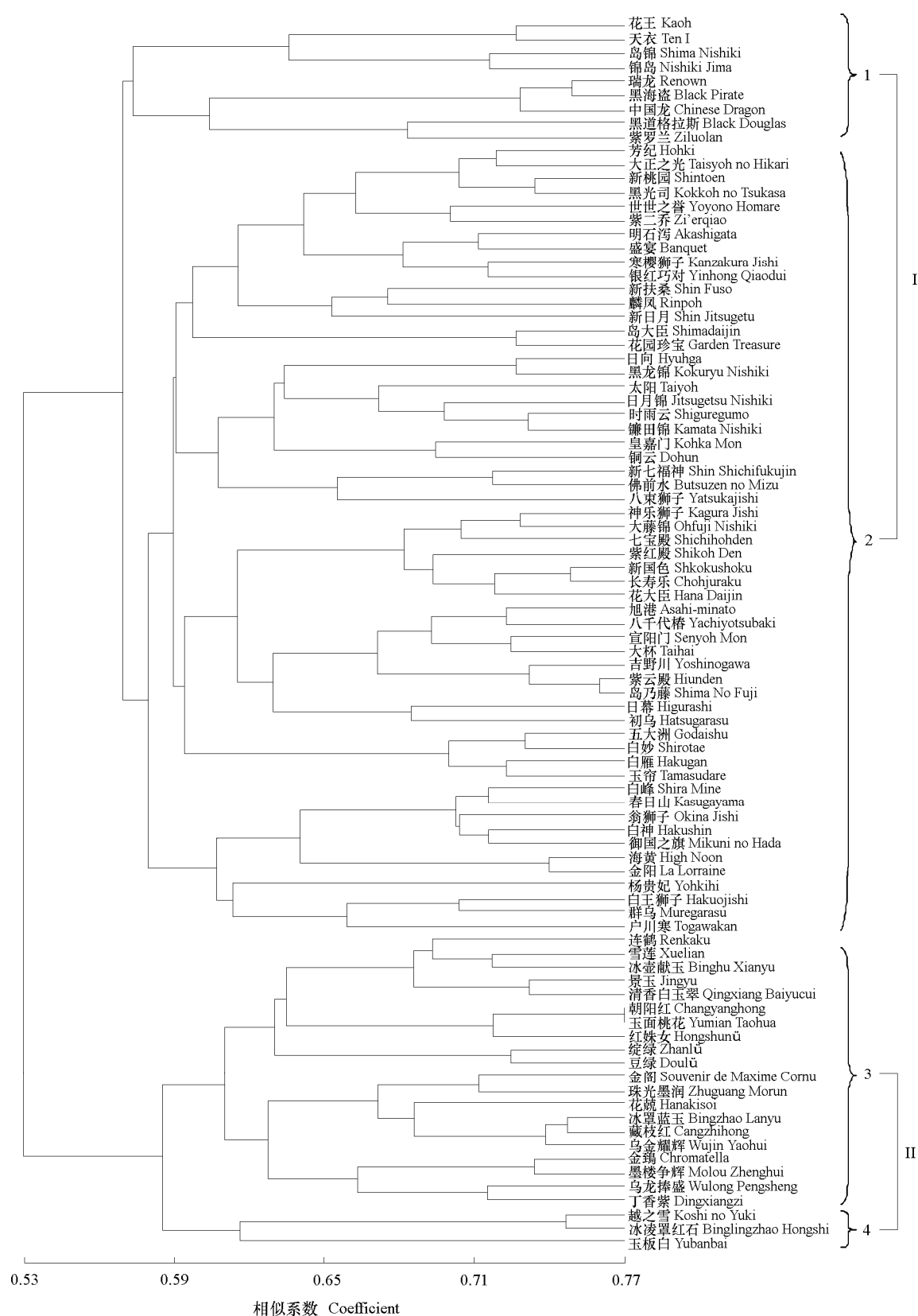


图 2 供试牡丹品种的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 The UPGMA clustering map of 89 tree peony cultivars constructed by UPGMA

第 3 亚类有 20 个品种, 包括 16 个国内品种 (占有国内品种的 76.19%), 2 个日本品种和 2 个法国品种。第 4 亚类有 3 个品种, 包括 1 个日本品种和 2 个国内品种, 均为白色花系。

3 讨论

ISSR 分子标记具有信息量大、结果稳定性高、不受环境条件控制的优点 (Reddy et al., 2002), 因此这种检测方法可以对常规形态学、细胞学特征等分类方法的起到一个补充的作用 (Nagaraju et al., 2002)。本研究中供试牡丹品种平均有效等位基因数、平均 Nei's 基因多样性指数、平均 Shannon's 信息指数与大菊 (缪恒彬 等, 2007)、腊梅 (赵冰和张启翔, 2008) 研究结果相似, 这些结果表明, 所选牡丹品种存在丰富的遗传变异。同时结合本课题前期形态标记研究 (周波 等, 2011), 采用 ISSR 分子标记方法可以更好地区分 89 个不同来源牡丹品种。

周波等 (2011) 对牡丹形态标记研究结果表明, 大部分国内品种单独聚为一类, 但日本品种被聚类为两大类群, 美国品种没有被很好地区分。本研究结果中, 96.61% 的日本品种聚为一类, 只有 '连鹤'、'花兢' 和 '越之雪' 与多数国内品种聚为一类, 这也说明上述日本品种与国内品种有着较近的亲缘关系。同时本研究中所有美国品种和法国品种相对集中的聚在一起。因此, ISSR 分子标记是对形态标记方法的一个很好的补充, 二者可以相互结合进行品种间的遗传关系的分析, 这与吴蕊等 (2011) 在紫牡丹杂交后代鉴定中的观点基本一致。

本研究中以 ISSR 分子标记为基础, 详细探讨 68 个引进品种 (国内大量引种栽培、生长表现良好且观赏性状特异) 与 21 个中国品种 (花型、花色典型) 之间的亲缘关系。结果发现多数国外品种和中国品种间的遗传距离比国内品种之间的遗传距离相对偏大, 表明这些引进品种在引种国的长期培养条件下已形成独具特色的国外品种群, 其中的部分品种可以作为新的育种资源加以利用。因此, 根据本研究的结果, 在育种实践中可以利用遗传距离相对较远的品种进行杂交, 创制新的牡丹种质。然而本研究中发现来源相同的牡丹品种 (如法国的 4 个品种) 也未全部聚到一起, 下一步可以通过增加 ISSR 引物、优化试验条件来深入探讨这些牡丹品种之间遗传多样性。

References

- Guan Kun. 2009. Identification on cross-subsection hybridization of tree peony in early stage [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 关 坤. 2009. 牡丹亚组间远缘杂交后的早期鉴定 [硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Hong De-yuan, Pan Kai-yu. 1999. Taxonomical history and revision of *Paeonia* sect. *Moutan* (Paeoniaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 37 (4): 351 - 368. (in Chinese)
- 洪德元, 潘开玉. 1999. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理. *植物分类学报*, 37 (4): 351 - 368.
- Li Jia-jue. 1999. Chinese tree peony and *Paeonia lactiflora*. Beijing: China Forestry Publishing House: 62 - 63. (in Chinese)
- 李嘉珏. 1999. 中国牡丹与芍药. 北京: 中国林业出版社: 62 - 63.
- Lin Qi-bing, Zhou Zhi-qin, Zhao Xuan, Pan Kai-yu, Hong De-yuan. 2004. Interspecific relationship among the wild species of *Paeonia* sect. *Moutan* DC. based on DNA sequences of *Adh* gene family. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (5): 627 - 632. (in Chinese)
- 林启斌, 周志钦, 赵 宣, 潘开玉, 洪德元. 2004. 基于 *Adh* 基因家族序列的牡丹组 (Sect. *Moutan* DC.) 种间关系. *园艺学报*, 31 (5): 627 - 632.
- Liu Ping, Wang Zi-cheng, Shang Fu-de. 2006. AFLP analysis of genetic diversity of *Paeonia suffruticosa* cultivars in Henan Province. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (6): 1369 - 1372. (in Chinese)
- 刘 萍, 王子成, 尚富德. 2006. 河南部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析. *园艺学报*, 33 (6): 1369 - 1372.

- Miao Heng-bin, Chen Fa-di, Zhao Hong-bo. 2007. Genetic relationship of 85 chrysanthemum [*Dendranthema × grandiflora* (Ramat.) Kitamura] cultivars revealed by ISSR analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (5): 1243 - 1248. (in Chinese)
- 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波. 2007. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析. *园艺学报*, 34 (5): 1243 - 1248.
- Nagaraju J, Kathirvel M, Subbaiah E V, Muthulakshmi M, Kumar L D. 2002. FISSR-PCR: A simple and sensitive assay for high throughput genotyping and genetic mapping. *Molecular and Cellular Probes*, 16: 67 - 72.
- Reddy M P, Sarla N, Siddiq E A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9 - 17.
- Suo Zhi-li. 2006. Screening and development of ISSR primers for identification of tree peony cultivars in *Paeonia suffruticosa* Andrews. *Biotechnology Bulletin*, (Supplement): 342 - 346. (in Chinese)
- 索志立. 2006. 牡丹品种鉴定用 ISSR 引物的筛选与开发. *生物技术通报*, (增刊): 342 - 346.
- Wang Jian-bo. 2002. ISSR markers and their applications in plant genetics. *Hereditas*, 24: 613 - 616. (in Chinese)
- 王建波. 2002. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用. *遗传*, 24: 613 - 616.
- Wu Rui, Zhang Xiu-xin, Xue Jing-qi, Mu Ding, Shi Yan-tong. 2011. Early identification of the descendents from distant hybridization of *Paeonia delavayi* by morphological and ISSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (12): 2325 - 2332. (in Chinese)
- 吴蕊, 张秀新, 薛璟琪, 穆鼎, 石颜通. 2011. 紫牡丹远缘杂交后代幼苗的形态标记和 ISSR 标记鉴定. *园艺学报*, 38 (12): 2325 - 2332.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, Ye Z H, Mao J X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre*, Canada: University of Alberta: 10.
- Zhao Bing, Zhang Qi-xiang. 2008. Genetic diversity of germplasm resources of *Chimonanthus praecox* based on ISSR analysis. *Bulletin of Botanical Research*, 28 (3): 315 - 320. (in Chinese)
- 赵冰, 张启翔. 2008. 蜡梅种质资源遗传多样性的 ISSR 分析. *植物研究*, 28 (3): 315 - 320.
- Zhao Xuan, Zhou Zhi-qin, Lin Qi-bing, Hong De-yuan, Pan Kai-yu. 2004. Molecular evidence for the interspecific relationships in *Paeonia* sect. *Moutan*: PCR-RFLP and sequence analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 42 (3): 236 - 244. (in Chinese)
- 赵宣, 周志钦, 林启冰, 洪德元, 潘开玉. 2004. 利用 PCR-RFLP 和 GPAT 基因技术研究芍药属牡丹组间关系的分子生物学证据. *植物分类学报*, 42 (3): 236 - 244.
- Zhou Bo, Jiang Hai-dong, Zhang Xiu-xin, Xue Jing-qi, Shi Yan-tong. 2011. Morphological diversity of some introduced tree peony cultivars. *Biodiversity Science*, 19 (5): 543 - 550. (in Chinese)
- 周波, 江海东, 张秀新, 薛璟琪, 石颜通. 2011. 部分引进牡丹品种的形态多样性. *生物多样性*, 19 (5): 543 - 550.
- Zou Yu-ping, Ge Song, Wang Xiao-dong. 2001. *Molecular markers of plant systematics and evolution*. Beijing: Science Press: 16 - 17, 108 - 121. (in Chinese)
- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社: 16 - 17, 108 - 121.