

芍药属牡丹组(*Paeonia* sect. *Moutan*)种间关系的分子证据:GPAT基因的PCR-RFLP和序列分析

^{1 2}赵 宣 ^{1 2}周志钦* ^{1 2}林启冰 ¹潘开玉 ¹洪德元*

∪ 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)

∩ (西南农业大学园艺系 重庆 400716)

Molecular evidence for the interspecific relationships in *Paeonia* sect. *Moutan*: PCR-RFLP and sequence analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene

^{1 2}ZHAO Xuan ^{1 2}ZHOU Zhi-Qin* ^{1 2}LIN Qi-Bing ¹PAN Kai-Yu ¹HONG De-Yuan*

∪ (Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

∩ (Department of Horticulture, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract A portion (the big intron between exon 5 and 6, ca. 2 kb) of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene of 15 wild tree peony accessions collected from 15 populations, which represent all the eight wild species in sect. *Moutan*, was analyzed using PCR-RFLP technique, and this portion of nine accessions, which represent also all the eight wild species, was sequenced for a better understanding of the interspecific relationships in this section. A reduced-median (RM) network of sect. *Moutan* was constructed with Network 3.0 computer program using the PCR-RFLP data obtained from the digestion experiments of 12 selected restriction enzymes. Both maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) trees of sect. *Moutan* were constructed with PAUP* 4.0 program using the sequences newly obtained in this study and from GenBank. As a result, a well resolved and highly supported gene tree of sect. *Moutan* (by bootstrap values) was obtained. The tree is basically in accordance with that constructed from morphological data. The phylogenetic relationships among species in sect. *Moutan* are discussed in detail.

Key words *Paeonia* sect. *Moutan*, interspecific relationships, molecular evidence.

摘要 为了探讨芍药属牡丹组 *Paeonia* sect. *Moutan* 的种间关系,对采自 15 个野生居群,代表牡丹组全部 8 个野生种的 15 份材料的 GPAT 基因片段(外显子 5 和 6 之间 2 kb 的内含子)进行了 PCR-RFLP 分析,并对代表牡丹组全部 8 个野生种的 9 份材料进行了测序。根据 12 个限制性内切酶的 PCR-RFLP 数据,使用 Network 3.0 计算机程序的 RM(reduced-median)法建立了牡丹组种间亲缘关系网络树。同时根据 8 个种 9 份材料的 GPAT 基因片段序列,利用 PAUP* 4.0 计算机程序建立了牡丹组 GPAT 基因的最大简约(MP)树和邻接(NJ)树。结果获得了具有很高自展值支持、分辨良好的牡丹组种间关系(GPAT 基因)树。最重要的是,该基因树所显示的牡丹组种间关系与根据形态学证据提出的牡丹组的种间关系基本吻合,并得到其他研究证据的支持。根据这一结果,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;种间关系;分子证据

2003-12-12 收稿,2004-02-05 收修改稿。

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-108);国家自然科学基金重点项目(30130030)资助(Supported by a Knowledge Innovation Project from the Chinese Academy of Sciences(Grant No. KSCX2-SW-108) and the National Natural Science Foundation of China(Grant No. 30130030))。

* 通讯作者(Authors for correspondence. E-mail: hongdy@ns. ibcas. ac. cn; zqzhoubj@yahoo.com)

芍药属 *Paeonia* L.(*Paeoniaceae*)分为 3 个组,即芍药组 sect. *Paeonia*、北美芍药组 sect. *Onaepia* Lindl.和牡丹组 sect. *Moutan* DC.(Stern, 1946)。牡丹组共有 8 个种,其中 3 个种分别有 2 个亚种,分布于我国的河南、甘肃、陕西、山西、安徽、湖北、四川、云南和西藏等 9 个省区(洪德元,潘开玉,1999a)。栽培牡丹不仅是中国的传统名花,也是世界名花。中国不仅是所有野生牡丹的原产地,而且也是栽培品种起源和发展的中心,世界各地的牡丹都是直接或间接从中国引进的(蓝保卿等,2002)。因此,阐明牡丹野生种间的关系有重要的理论和实践价值。

在以往的研究中,国内外学者分别从形态学(洪德元,潘开玉,1999a;洪涛等,1992)、细胞学(洪德元等,1988)、孢粉学(席以珍,1984)、地理分布(潘开玉,1995)以及分子标记(邹喻萍等,1999)和基因序列分析(Sang et al., 1997; Tank & Sang, 2001; Ferguson & Sang, 2001)等多方面对牡丹野生种类间的关系进行了研究。由于不同研究所用的材料不完全相同,且材料的代表性有限,因此,不同研究的结果并不完全一致(邹喻萍等,1999;于玲等,1998; Tank & Sang, 2001)。到目前为止,我们对牡丹组的种间亲缘关系仍然缺乏完整的了解。已有研究表明,低拷贝基因中快速进化的内含子在解决种间系统关系时能提供较叶绿体基因和其他核基因更充足的证据(Doyle et al., 1996; Sang et al., 1997; Small et al., 1998; Emswiller & Doyle, 1999)。GPAT(glycerol-3-phosphate acyltransferase)基因是一个核基因编码、叶绿体表达的单拷贝基因,它编码的三磷酸甘油酸酰基转移酶是甘油酯合成中所必需的酶。Tank 和 Sang(2001)在分析芍药属植物的 GPAT 基因时发现,GPAT 基因外显子 5 和 6 之间含有一个大于 2.0 kb 的内含子,他们利用该内含子序列对芍药属 13 个种的 19 份材料进行了系统发育关系的分析,结果得到了分辨良好、自展值高的基因树,解决了使用 ITS、*matK*、*Adh* 等基因所没有解决的牡丹组中紫斑牡丹 *P. rockii* (S. G. Haw & Lauener) T. Hong & J. J. Li ex D. Y. Hong 和四川牡丹 *P. decomposita* Hand.-Mazz.(= *P. szechuanica* W. P. Fang)、芍药组中的窄叶芍药 *P. anomala* L.和川赤芍 *P. anomala* ssp. *veitchii* (Lynch) D. Y. Hong & K. Y. Pan 等种间关系问题。但他们的研究中仅涉及牡丹组的紫斑牡丹、滇牡丹 *P. delavayi* Franch.、四川牡丹和矮牡丹 *P. jishanensis* T. Hong & W. Z. Zhao(= *P. suffruticosa* ssp. *spontanea* (Rehder) S. G. Haw & Lauener)等 4 个类群。因此,本研究在 Tank 和 Sang(2001)的研究基础上,利用我国野生牡丹的资源优势,对牡丹组全部 8 个种的 15 份材料进行了 GPAT 基因片段的 PCR-RFLP 分析,并对其中 9 份材料进行了核苷酸序列分析,希望为阐明牡丹组的种间进化关系找到直接的分子证据。

1 材料和方法

1.1 材料

材料来源见表 1。凭证标本保存于中国科学院植物研究所标本馆(PE)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取使用改良的 CTAB 法(Doyle & Doyle, 1987),从硅胶干燥的叶片中提取。总 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检查后,根据浓度的大小稀释至 5–10 ng/ μ L 用作 PCR 扩增的模板。

1.2.2 PCR-RFLP 分析 用于 RFLP 分析的 PCR 产物由两次 PCR 扩增获得。第一次扩

表 1 材料来源

Table 1 Source of materials

分类群 Taxon	缩写 Abbreviation	采集人/ID号 Voucher/ID	采集地 Provenance
圆裂四川牡丹 <i>Paeonia decomposita</i> ssp. <i>rotundiloba</i> D. Y. Hong	rot 16*	洪德元等 (D. Y. Hong et al.) H02016	四川彭州 Pengzhou, Sichuan
四川牡丹 <i>P. decomposita</i> Hand.-Mazz. ssp. <i>decomposita</i> (<i>P. szechuanica</i> W. P. Fang)	sze	AY016276	四川马尔康 Barkam, Sichuan
矮牡丹 <i>P. jishanensis</i> T. Hong & W. Z. Zhao	jis 77*	周志钦 (Z. Q. Zhou) H02077	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu
(<i>P. suffruticosa</i> ssp. <i>spontanea</i> (Rehder) S. G. Haw & Lauener)	spo	AY016274	山西稷山 Jishan, Shanxi
卵叶牡丹 <i>P. qiu</i> Y. L. Pei & D. Y. Hong	qiu 80*	周志钦 (Z. Q. Zhou) H02080	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu
凤丹 <i>P. ostii</i> T. Hong & J. X. Zhang	ost 106*	洪德元 潘开玉 (D. Y. Hong & K. Y. Pan) H02106	河南卢氏 Lushi, Henan
	ost 78	周志钦 (Z. Q. Zhou) H02078	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu
银屏牡丹 <i>P. suffruticosa</i> ssp. <i>yiningmudan</i> D. Y. Hong, K. Y. Pan & Z. W. Xie	yin 117* yin 118	潘开玉 谢中稳 (K. Y. Pan & Z. W. Xie) H9701 洪德元 (D. Y. Hong) H97010	安徽巢湖 Chaohu, Anhui 河南嵩县 Song Xian, Henan
紫斑牡丹 <i>P. rockii</i> (S. G. Haw & Lauener) T. Hong & J. J. Li ex D. Y. Hong ssp. <i>rockii</i>	roc 121* roc 76 roc	洪德元等 (D. Y. Hong et al.) H97015 周志钦 (Z. Q. Zhou) H02076 AY016280	河南内乡 Neixiang, Henan 甘肃兰州 Lanzhou, Gansu 甘肃文县 Wen Xian, Gansu
太白山紫斑牡丹 <i>P. rockii</i> ssp. <i>taibaishanica</i> D. Y. Hong	tai 122* tai 74	洪德元等 D. Y. Hong et al. H97058 周志钦 (Z. Q. Zhou) H02074	陕西太白山 Mt. Taibaishan, Shaanxi 甘肃兰州 Lanzhou, Gansu
滇牡丹 <i>P. delavayi</i> Franch.	del 123* del 11 del	周世良 (S. L. Zhou) H02123 洪德元等 (D. Y. Hong et al.) H02011 AY016270	西藏林芝 Nyingchi, Xizang 四川彭州 Pengzhou, Sichuan 云南丽江 Lijiang, Yunnan
大花黄牡丹 <i>P. ludlowii</i> (Taylor & Stern) D. Y. Hong	lud 124* lud 83	周世良 (S. L. Zhou) H02124 周志钦 (Z. Q. Zhou) H02083	西藏林芝 Nyingchi, Xizang 甘肃榆中 Yuzhong, Gansu

* , 表示用于测序的材料。Asterisks indicate the sequenced accessions.

增使用引物 GAF5(5'-CCCTGTTCTCTGGAATGGAAG-3')和 GAR5(5'-CATGCTGAATGGCTTGCAAAG-3') (Tank & Sang, 2001)。扩增程序为:(1)94℃,4 min;(2)94℃,1 min;59℃,45 s;72℃,2 min,重复(2)4次;(3)94℃,20 s;57℃,45 s;72℃,2 min;重复(3)30次;(4)72℃,10 min。由于第一次 PCR 得到的产物浓度低,而且不同模板产物量差异很大,不利于酶切分析。因此,我们利用 GenBank 中牡丹的 GPAT 基因序列(GenBank Nos. AY016270、AY016276、AY016280、AY016274)重新设计了引物 GAF2(5'-GACGATGATATYTTTCATGC-3')和 GAR1(5'-TTTGAGACACAGAAGCACC-3'),并进行二次扩增。将第一次扩增产物用 Pharmacia 纯化试剂盒纯化后,作为第二次 PCR 的模板。第二次扩增程序为:(1)70℃,4 min;(2)94℃,1 min;56℃,30 s;72℃,2 min;重复(2)1次(3)94℃,20 s;56℃,30 s;72℃,2 min;重复(3)34次;(4)72℃,10 min。全部 PCR 扩增在 PTC-200(PE 公司)热循环仪上完成。

利用 Dnasis 程序(www.olygo.net/dnasis.htm)对 GenBank 中现有的 GPAT 基因序列的酶切位点进行初步分析,根据不同酶的酶切位点在种间的差异以及酶切位点在扩增片段上的分布,选择了 12 个限制性内切酶:*Taq*I、*Bcl*I、*Hinf*I、*Xba*I、*Mse*I、*Rsa*I、*Dde*I、*Ban*II、*Sca*I、*Alu*I、*Sau*96I、*Nla*III 用于正式的分析。酶切反应体系为 10 μ L,其中含 PCR 产物约 400 ng,内切酶 2-4 个单位,其余成分根据不同的酶按照说明书进行。酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳(0.5% \times TBE)分离,在 Photo-Dye 紫外透射仪上观察和照相。DNA 分子量标准为 D015-X(鼎国公司)。

1.2.3 核苷酸测序 为了与 PCR-RFLP 分析的数据进行相互印证并检测酶切位点的可靠性,我们对牡丹组 8 个野生种(其中紫斑牡丹两个亚种)的 9 份代表材料(表 1)的 GPAT 基因片段进行了测序。首先,使用 GAF2 和 GAR1 进行扩增,PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳分离后割胶回收,利用 Pharmacia 纯化试剂盒纯化。纯化产物连接到 pGEM-T-easy 载体(Promega 公司)上进行克隆。每个样品挑取 12 个阳性克隆,经 *Eco*RI 酶切检测后,在 ABI377 自动测序仪上进行测序。

1.2.4 数据分析 GPAT 基因序列用 Clustal W(Thompson et al., 1997)进行序列对齐并经手工校正后,检查序列上的酶切位点与琼脂糖凝胶上的酶切式样是否一致。对验证后的变异位点进行 01 编码得到 01 数据矩阵,然后利用 Network 3.0(www.fluxus-engineering.com)中的 RM(reduced-median)方法进行分析。

基因树的构建利用 PAUP* 4.0 软件(Swofford, 1998)。最大简约(maximum parsimony, MP)树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。邻接树(neighbor-joining, NJ)的构建使用 Kimura 距离。所有自展值分析(bootstrap)重复 1000 次,以检验树拓扑结构的可靠性。在基因树的构建中,我们使用了 GenBank 中如下序列:芍药组的 *P. lactiflora* (AY016249)、*P. anomala* ssp. *veitchii* (AY016253)和 *P. obovata* (AY016256)、北美芍药组的 *P. californica* (AY016285)序列作外类群,牡丹组的 *P. delawayi* (AY016270)、*P. decomposita* (AY016276)、*P. rockii* (AY016280)和 *P. jishanensis* (AY016274)序列(Tank & Sang, 2001)参与分析。

2 结果和分析

2.1 GPAT 基因酶切位点变异与牡丹组种间关系

利用引物 GAF5 和 GAR5 对牡丹野生种的基因组 DNA 进行第一次扩增,获得的 GPAT 基因片段长约 2.5 kb,经引物 GAF2 和 GAR1 第二次扩增后得到的片段长约 1.9 kb。用 12 个限制性内切酶对全部分析材料的 PCR 产物进行酶切分析。根据酶切结果(胶图式样)并结合 GPAT 基因序列进行分析,共证实了 54 个酶切位点,其中 23 个位点在分析的材料中表现出变异(表 2)。根据表 2 的数据,利用 Network 3.0 计算机程序建立了牡丹组种间亲缘关系,结果如图 1。图 1 显示,夙丹居中,其余种向四周辐射分布。其中滇牡丹和大花黄牡丹、矮牡丹和卵叶牡丹、圆裂四川牡丹和紫斑牡丹各聚为一支,而银屏牡丹独

表 2 12 个限制性内切酶在研究的 15 份材料中的酶切位点变异

Table 2 Variations of the restriction digestion sites of 12 restriction enzymes among the 15 accessions of the wild tree peonies studied

酶 Restriction enzyme	代码 Code	信息位点 ¹⁾ Informative site	样品 Sample ²⁾														
			rot 16	jis 77	qiu 80	ost 106	yin 117	roc 121	tai 122	del 123	lud 124	ost 78	yin 118	roc 76	tai 74	del 11	lud 83
<i>TaqI</i>	a	617	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>BclI</i>	b	1736	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>HinII</i>	c	660	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>HinII</i>	c	1527	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>XbaI</i>	d	544	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MseI</i>	e	473	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
<i>MseI</i>	e	733	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>MseI</i>	e	1076	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>MseI</i>	e	1136	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
<i>RsaI</i>	f	1038	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>RsaI</i>	f	1345	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>DdeI</i>	g	426	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>DdeI</i>	g	535	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>DdeI</i>	g	1279	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>DdeI</i>	g	1485	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
<i>DdeI</i>	g	1634	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>BanII</i>	h	561	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>ScaI</i>	i	1347	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>AluI</i>	j	1382	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
<i>AluI</i>	j	1633	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>NlaIII</i>	k	986	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Sau96I</i>	l	591	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Sau96I</i>	l	1172	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1

1) 引起酶切位点改变的核苷酸变异位点。2) 表中“0”表示无酶切位点,“1”表示有酶切位点。缩写见表 1。

1) Positions of the nucleotide substitutions which caused variations of the restriction digestion site of the enzymes used in this study.

2) The number “0” indicates lack of the restriction digestion site, while “1” indicates presence of the restriction digestion site. The abbreviations are the same as those in Table 1.

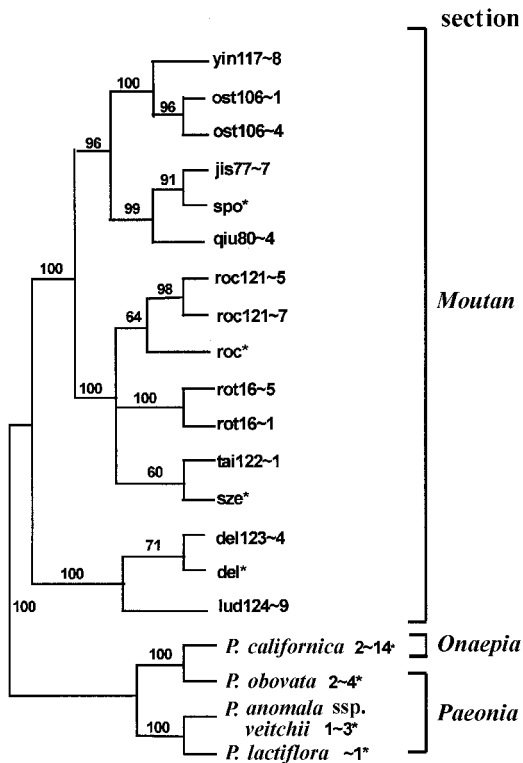


图2 牡丹组种间关系的 GPAT 基因邻接树 分支上的数字为 >50% 的自展支持率, “~” 后的数字代表克隆号。* 代表从 GenBank 下载的序列。

Fig. 2. The neighbor-joining (NJ) tree of sect. *Moutan* based on GPAT gene sequences. Numbers above branches indicate bootstrap values above 50%, and numbers behind the symbol “~” indicate No. of clones. Asterisks indicate the sequences downloaded from GenBank.

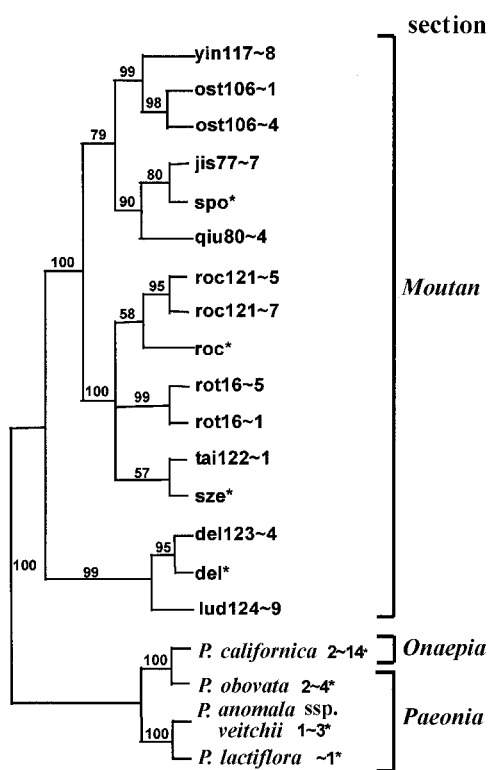


图3 建立在 3 棵最大简约树基础上的牡丹组种间关系严格一致树 (CI = 0.8966, RI = 0.8047, 树长 319) 分支上的数字为 >50% 的自展支持率, “~” 后的数字代表克隆号。* 代表来自 GenBank 的序列。

Fig. 3. The strict consensus tree of sect. *Moutan* based on the three most parsimony trees (CI = 0.8966, RI = 0.8047, Tree length = 319). Numbers above branches indicate bootstrap values above 50%, and numbers behind the symbol “~” indicate No. of clone. Asterisks indicate the sequences downloaded from GenBank.

3 讨论

在以往的研究中,不同的学者利用不同的证据对牡丹组的种间关系进行了一系列的研究,但都因使用的材料不完全(邹喻苹等,1999;于玲等,1998;Tank & Sang, 2001),或因使用基因的变异速率太低(Sang et al., 1997),而未能获得揭示牡丹组种间关系的有力证据。本研究在 Tank 和 Sang(2001)研究的基础上,利用 GPAT 基因序列建立了分辨率良好的牡丹组种间关系基因树(图 2, 3)。在 MP 和 NJ 树中,牡丹组各种的不同样品(或同一样品的不同克隆)首先聚为一支。惟一例外的是太白山紫斑牡丹和四川牡丹这两个种聚为一支,自展值分别为 57%(MP 树)和 60%(NJ 树),并且紫斑牡丹和四川牡丹的这种关系并未得到网络树(图 1)的支持。因此,我们认为本研究获得了目前为止最清楚的牡丹组种间关系树。更重要的是,这一分子证据支持的牡丹组种间关系与我们根据形态学性状建立的牡丹组种间关系相当吻合(周志钦等,2003)。

从图 2 和图 3 可以看到,牡丹组分为两个大的分支,一支包括滇牡丹和大花黄牡丹两

个种;另一支包括其余 6 个种。在形态上滇牡丹和大花黄牡丹相似:花为聚伞花序,花盘肉质且短;其余 6 种与之有显著差异:花单生,花盘革质(Hong, 1997;洪德元,潘开玉, 1999a)。在地理分布上,它们也是异域的。以四川省大雪山为界,前两种仅见于大雪山以西,而其余 6 个种仅见于以东地区(洪德元,潘开玉, 1999a)。这也与 Stern(1946)划分的两个亚组基本吻合。

在剩余 6 个种构成的分支内,矮牡丹、卵叶牡丹、凤丹和银屏牡丹构成一支,自展值分别为 96%(NJ 树,图 2)和 79%(MP 树,图 3)。它们是 Hong 和 Pan(1999b)提出的 *P. suffruticosa* 复合体(还包括紫斑牡丹)的成员。这 4 个种在叶片、花部形态等方面具有多个共同特征,关系非常密切(Hong & Pan, 1999b)。因此,形态学和分子证据的结果是一致的。至于四川牡丹和紫斑牡丹间的关系,Tank 和 Sang(2001)利用 GPAT 基因序列对牡丹组的滇牡丹、矮牡丹、四川牡丹和紫斑牡丹 4 个种进行了研究,结果表明四川牡丹与紫斑牡丹的关系更近于矮牡丹(Tank & Sang, 2001)。Hong 和 Pan(1999b)基于四川牡丹与 *P. suffruticosa* 复合体内各种的差异,未把四川牡丹归在 *P. suffruticosa* 复合体内。本文的研究结果表明,*P. suffruticosa* 复合体的 5 个种没有形成单系类群(图 2, 3),这与形态证据不完全吻合。但同时也证明了四川牡丹与紫斑牡丹有非常密切的亲缘关系。这一点与其他学者的研究结果是一致的(Sang et al., 1997; Sang & Zhang, 1999; 邹喻苹等, 1999; Tank & Sang, 2001)。

参 考 文 献

- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11 - 15.
- Doyle J J, Kanazin V, Shoemaker R C. 1996. Phylogenetic utility of histone H3 intron sequences in the perennial relatives of soybean (*Glycine*: Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 438 - 447.
- Emshwiller E, Doyle J J. 1999. Chloroplast-expressed glutamine synthetase (npsGS): potential utility for phylogenetic studies with an example from *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 310 - 319.
- Ferguson D, Sang T. 2001. Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies (*Paeonia*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 3915 - 3919.
- Hong D-Y (洪德元). 1997. *Paeonia* (Paeoniaceae) in Xizang (Tibet). *Novon* 7: 156 - 161.
- Hong D-Y (洪德元), Pan K-Y (潘开玉). 1999a. Taxonomical history and revision of *Paeonia* sect. *Moutan* (Paeoniaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 37: 351 - 368.
- Hong D-Y, Pan K-Y. 1999b. A revision of the *Paeonia suffruticosa* complex (Paeoniaceae). *Nordic Journal of Botany* 19: 289 - 299.
- Hong D-Y (洪德元), Zhang Z-Y (张志宪), Zhu X-Y (朱相云). 1988. Studies on the genus *Paeonia* (1) — Report of karyotypes of some wild species in China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 26: 33 - 43.
- Hong T (洪涛), Zhang J-X (张家勋), Li J-J (李嘉珏), Zhao W-Z (赵文忠), Li M-R (李明瑞). 1992. Study on the Chinese wild woody peonies: (I) new taxa of *Paeonia* L. sect. *Moutan* DC. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究) 12: 223 - 234.
- Lan B-Q (蓝保卿), Li J-J (李嘉珏), Duan Q-X (段全绪). 2002. An Encyclopedia of Tree Peonies in China (中国牡丹全书). Beijing: Chinese Science and Technology Press. 1 - 310.
- Pan K-Y (潘开玉). 1995. The analysis of distribution pattern in the Paeoniaceae and its formation. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 33: 340 - 349.
- Sang T, Donoghue M J, Zhang D. 1997. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in peonies (*Paeonia*):

- phylogenetic relationships of putative nonhybrid species. *Molecular Biology and Evolution* 14: 994 – 1007.
- Sang T, Zhang D. 1999. Reconstructing hybrid speciation using sequences of low copy nuclear genes: hybrid origins of five *Paeonia* species based on *Adh* gene phylogenies. *Systematic Botany* 24: 148 – 163.
- Small R L, Ryburn J A, Cronn R C, Seelanan T, Wendel J F. 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany* 85: 1301 – 1315.
- Stern F C. 1946. A Study of the Genus *Paeonia*. London: The Royal Horticultural Society. 1 – 155.
- Swofford D L. 1998. PAUP* 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*, and other method). Beta version. Sunderland: Sinauer, Associates.
- Tank D C, Sang T. 2001. Phylogenetic utility of the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene: evolution and implications in *Paeonia* (Paeoniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 421 – 429.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876 – 4882.
- Xi Y-Z (席以珍). 1984. The pollen morphology and exine ultrastructure of *Paeonia* L. in China. *Acta Botanica Sinica (植物学报)* 26: 241 – 246.
- Yu L (于玲), He L-X (何丽霞), Li J-J (李嘉珏), Cheng F-Y (成仿云). 1998. Comparative studies on protein zones of wild tree peony species. *Acta Horticulturae Sinica (园艺学报)* 25: 99 – 101.
- Zhou Z-Q (周志钦), Pan K-Y (潘开玉), Hong D-Y (洪德元). 2003. Phylogenetic analyses of *Paeonia* section *Moutan* (tree peonies, Paeoniaceae) based on morphological data. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 41: 436 – 446.
- Zou Y-P (邹喻苹), Cai M-L (蔡美琳), Wang Z-P (王子平). 1999. Systematic studies on *Paeonia* sect. *Moutan* DC. based on RAPD analysis. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)* 37: 220 – 227.