

部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析

侯小改^{1,2}, 尹伟伦¹, 李嘉珏³, 王华芳¹

(¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²河南科技大学农学院, 洛阳 471003; ³洛阳大学环境与化学工程学院, 洛阳 471023)

摘要: 【目的】研究牡丹遗传多样性为合理利用牡丹种质资源、培育观赏价值高的牡丹新品种提供依据。【方法】利用荧光标记 AFLP 技术, 采用 8 对 M+3 和 P+3 引物组合对 30 份牡丹栽培品种进行了总基因组 DNA 水平上的多态性检测。【结果】检测结果共获得 1 123 条可统计的条带, 其中 965 条呈多态性, 多态性带百分率达 86%。揭示了牡丹栽培种质丰富的遗传多样性。8 组引物在 30 个品种中检测到数目不等的品种特异带型, 这些品种的特异带型对供试牡丹品种具有一定的鉴别价值。【结论】8 对引物能将 30 个牡丹品种完全区分开。聚类分析结果表明多数来源地相同的牡丹种质表现出较为密切的亲缘关系。

关键词: 牡丹; 遗传多样性; AFLP 分析

AFLP Analysis of Genetic Diversity of 30 Tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) Cultivars

HOU Xiao-gai^{1,2}, YIN Wei-lun¹, LI Jia-jue³, WANG Hua-fang¹

(¹ College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083;

² Agricultural College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003;

³ College of Environmental and Chemical Engineering, Luoyang University, Luoyang 471023)

Abstract: 【Objective】Investigation of the tree peony's genetic diversity (*Paeonia suffruticosa* Andr.) is significant in utilizing its germplasm resources and cultivating new varieties. 【Method】The phylogenetic relationships among 30 tree peony cultivars were analyzed using AFLP to study the genetic diversity with eight AFLP primer combinations (M+3 and P+3). 【Result】Among the 1123 bands detected, 965 bands were polymorphic and specific bands were found in all 30 tree peony cultivars. The high ratio of polymorphic bands (86%) observed in this study indicate abundant genetic diversity among tree peony cultivars. 【Conclusion】Our results suggest that the 8 pairs of prime combinations could be used to distinguish between all cultivars being tested. Results of cluster analysis showed that the classification based on AFLP markers of cultivars was consistent with their origin.

Key words: Tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.); Genetic diversity; AFLP analysis

0 引言

【本研究的重要意义】芍药属 (*Paeonia* L.) 牡丹组 (sect. *Moutan* DC.) 植物为中国特有, 栽培品种也起源于中国^[1], 遗传资源十分丰富。但由于对其遗传背景、亲缘关系缺乏深入系统的研究, 致使育种工作受到很大限制。【前人研究进展】目前对牡丹品种遗传多样性的研究主要集中在形态特征、染色体特征及同工酶等方面。王莲英^[2]按花型等特征不同记载了

中原牡丹品种 400 个, 李嘉珏^[3]也根据花型等特征记载了西北、西南、江南牡丹品种 430 个。袁涛^[4]观察了 4 个栽培品种群 48 个牡丹品种的花粉形态特征, 发现各品种群间在花粉粒的大小、形状和两极特征上差异不大, 但外壁饰纹差异显著, 各有特点。关于牡丹栽培品种的染色体核型研究报道较少, 仅对 28 个品种进行了核型分析, 各品种间核型多样性很贫乏, 品种间核型差异很小, 仅在个别染色体上有一定范围内的变异^[5]。张赞平等^[6]、于玲等^[7]对部分牡丹品种的

收稿日期: 2006-02-14; 接受日期: 2006-05-22

基金项目: 河南省自然科学基金 (0411030200) 项目和河南省科技攻关项目 (20050304)

作者简介: 侯小改 (1966-), 女, 河南焦作人, 博士研究生, 副教授, 研究方向为植物生物技术。Tel: 0379-64282382; E-mail: hxg382@163.com。通讯作者王华芳 (1956-), 男, 云南人, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物生物技术。Tel: 010-62338249; E-mail: hfwang@bjfu.edu.cn

Giemsa C 带特征进行了分析,认为 C 带差异具有品种特异性,可作为区分和鉴别品种的重要特征。陈道明等^[8]应用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测了 49 个牡丹品种的酯酶同工酶,并以此探讨了各类群及各品种间的相互关系。近几年来,分子标记技术的快速发展为在 DNA 水平上估计牡丹种质的遗传差异提供了更准确、更高效的方法。利用 RAPD 技术,陈向明等^[9]对 35 个不同花色牡丹品种亲缘关系进行分析,认为来源相同、花色相同的品种间亲缘关系相对较近,但多数遗传组的划分与花色系列间并未有一致的关系;Hosoki T 等^[10]对 19 个牡丹品种亲缘关系进行分析,得出遗传聚类组的划分与花色并不完全一致。孟丽等^[11]对 11 个牡丹野生类群和 12 个栽培品种亲缘关系进行分析,认为与栽培牡丹间亲缘关系从近到远依次为:杨山牡丹、四川牡丹、卵叶牡丹、紫斑牡丹和矮牡丹,RAPD 试验扩增出的 25 个特异标记可用于牡丹组内种间、品种间的分类与鉴定。邹喻苹等^[12]利用 RAPD 标记分析了牡丹组内与种间遗传关系,结果与洪德元根据形态性状对该组所做的分类处理基本相符。【本研究切入点】牡丹栽培历史悠久,在长期的驯化栽培、自然和人工选择下,形成了丰富的遗传变异。再加上牡丹能以多种方式繁殖,使得品种间的遗传关系模糊不清,对进一步选育新品种造成诸多困难。AFLP (扩增片段长度

多态性)作为一种分子标记因其具有带型丰富、用样量少、灵敏度高、快速高效等特点,已被用于检测遗传多样性、构建遗传图谱和定位克隆基因、天然居群的遗传结构与保护生物学研究等方面^[13],已成为材料间遗传多样性和分类研究的有效手段^[14-16]。但有关 AFLP 技术在牡丹种质资源遗传多样性及亲缘关系的研究报道却很少。【拟解决的关键问题】本研究利用荧光 AFLP 技术,对 30 个来自不同地区的牡丹品种进行分析,旨在从分子水平上探索牡丹品种间的遗传差异,为合理利用牡丹种质资源,培育观赏价值高的牡丹新品种提供分子水平上的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试牡丹品种共 30 份列于表 1,均为当地常见或优良品种,其中中原品种 15 份(1~15),江南品种 3 份(16~18),西北品种 4 份(19~22),西南品种 2 份(29~30),日本品种 3 份(23~25),欧美品种 3 份(26~28)。因有些国外品种当地引种较少,使得取材的份数受到限制。1~15 和 26~28 份材料采自中国洛阳国家牡丹基因库,16~18 和 29~30 份材料采自洛阳牡丹研究所引种圃,19~25 份材料采自洛阳市王城公园引种圃。

表 1 供试材料一览表

Table 1 The list of cultivars used in the study

序号 No.	品种名 Cultivar	来源 Origin	序号 No.	品种名 Cultivar	来源 Origin
1	瓔珞宝珠 Yingluobaozhu	洛阳 Luoyang, China	16	云芳 Yunfang	安徽 Anhui, China
2	春归华屋 Chunguihuawu	洛阳 Luoyang, China	17	西施 Xishi	安徽 Anhui, China
3	蓝田玉 Lantianyu	洛阳 Luoyang, China	18	徽紫 Huizi	安徽 Anhui, China
4	小胡红 Xiaohuhong	洛阳 Luoyang, China	19	玛瑙盘 Manaopan	甘肃 Gansu, China
5	青山贯雪 Qingshanguanxue	洛阳 Luoyang, China	20	棕斑白 Zongbanbai	甘肃 Gansu, China
6	佛门袈裟 Fomenjiasha	洛阳 Luoyang, China	21	茶花状元 Chahuazhuangyuan	甘肃 Gansu, China
7	豆绿 Doulu	洛阳 Luoyang, China	22	紫绢 Zijuan	甘肃 Gansu, China
8	丹炉焰 Danluyan	洛阳 Luoyang, China	23	天衣 Tianyi	日本 Japan
9	银粉金鳞 Yinfenjinlin	洛阳 Luoyang, China	24	花镜 Huajing	日本 Japan
10	藏枝红 Cangzhihong	洛阳 Luoyang, China	25	花王 Huawang	日本 Japan
11	桃红献媚 Taohongxianmei	洛阳 Luoyang, China	26	海黄 Haihuang	美国 America
12	金玉交章 Jinyujiaozhang	洛阳 Luoyang, China	27	茶黄 Chahuang	法国 France
13	金星雪浪 Jinxingxuelang	洛阳 Luoyang, China	28	金阁 Jinge	法国 France
14	夜光白 Yeguangbai	洛阳 Luoyang, China	29	七蕊 Qirui	四川 Sichuan, China
15	玉楼点翠 Yuloudiancui	洛阳 Luoyang, China	30	彭州紫 Pengzhouzi	四川 Sichuan, China

1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 制备 采用改进的 CTAB 法^[13]从硅胶干燥好的幼叶中提取总 DNA。

1.2.2 AFLP 利用北京鼎国生物技术公司的试剂盒

及其操作指南进行。各样品基因组 DNA 的酶切和接头的连接在同一反应中进行。在 20 μl 反应体系中含有 DNA 模板 4 (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) μl , *Pst*I 和 *Mse*I 接头 1 μl , *Pst*I (4U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 和 *Mse*I (4U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 2 μl , 10 Reaction buffer

2.5 μl , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP 2.5 μl , T4 Ligase (3U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 1 μl , 超纯水 7 μl 。将上述混合液混匀离心数秒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 h, 8 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

预扩增反应 用预扩增引物组合进行预扩增。反应体系为 25 μl 。含酶切-连接产物 2 μl , *Pst*I 和 *Mse*I 预扩增引物 1 μl , dNTPs 0.5 μl , 10 \times PCR buffer 2.5 μl , Taq DNA 聚合酶 (2U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 0.5 μl , 超纯水 18.5 μl 。预扩增反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s, 循环 30 次。预扩增产物稀释 20 倍, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

选择性扩增反应 用荧光标记的经过筛选的 8 对引物 (表 2) 进行正式选择性扩增。其中 *Mse*I 引物的 5' 端用荧光染料进行标记。反应体系为 25 μl 。含预扩增产物稀释后的 DNA 样品 2 μl , 10 \times PCR buffer 2.5 μl , dNTPS 0.5 μl , *Pst*I 引物 (5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 1 μl , *Mse*I 引物 (30 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 1 μl , Taq 酶 (2U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 0.5 μl , 超纯水 17.5 μl 。选择性扩增 PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ (以后每轮循环温度递减 0.7 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 扩增 12 轮; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s,

再进行 23 个循环。

电泳与数据处理取选择扩增后的样品在 ABI 377 自动测序仪上电泳分离检测, 得到 AFLP 的 DNA 指纹图谱。利用 GeneScan 3.1 软件将 30 个个体 8 对荧光引物产生的电泳胶图转换为 0, 1 矩阵。用 NTSYS 2.11 版软件中的 DICE 法计算样品间的相似系数, 并用 SAHNClustering 进行不加权成对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 不同引物组合扩增产物的多态性

利用从 64 对引物中筛选出的 8 对 AFLP 引物对 30 份牡丹种质的基因组 DNA 进行片段长度多态性扩增, 获得了较好的扩增结果 (表 2, 图 1)。共扩增出 1123 条谱带 (50~500 bp), 其中 965 条具有多态性, 占 86%, 平均每对引物扩增出 140 条可统计的带, 其中 121 条具有多态性。可见, AFLP 检测牡丹种质资源遗传多样性的效率很高, 也充分体现了该组植物的遗传多样性。

表 2 8 对 AFLP 选择性扩增引物产生的条带多态性

Table 2 Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on the 8 primer pairs

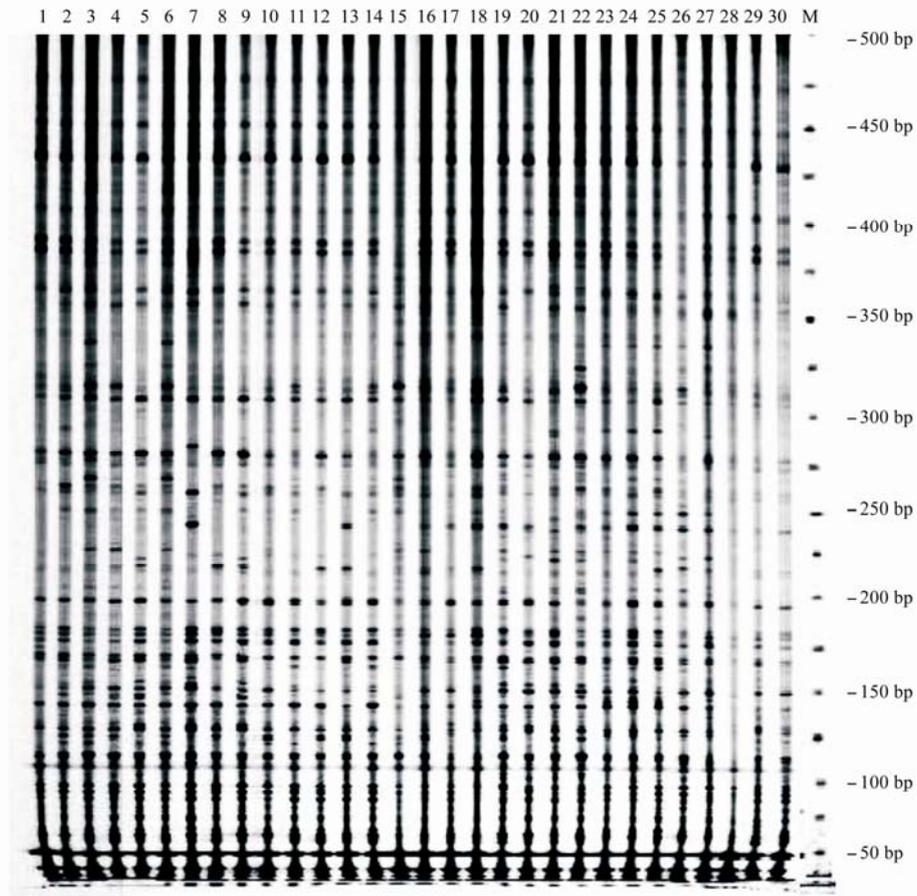
序号 No.	引物组合 Primer combination	总带数 Total band number	多态性带数 Polymorphic band number	多态性位点百分率 Polymorphic band percentage (%)
1	P-GAA/M-CTG	125	106	85
2	P-GAC/M-CAA	145	127	88
3	P-GAC/M-CAC	134	116	87
4	P-GAC/M-CTT	148	135	91
5	P-GTG/M-CAT	128	106	83
6	P-GTT/M-CAT	142	126	89
7	P-GTT/M-CTA	149	114	77
8	P-GTT/M-CTG	152	135	89
合计 Total		1123	965	
平均 Average		140	121	86

2.2 30 份牡丹种质的聚类分析

30 份牡丹种质两两间的相似系数分布在 0.52~0.83 之间, 其中 15 号 (玉楼点翠) 与 27 号 (茶黄) 的相似系数最小, 为 0.52, 表明 2 种质间的亲缘关系最远。3 号 (蓝田玉) 与 6 号 (佛门袈裟) 的相似系数最大, 为 0.83, 表明 2 种质间的亲缘关系最近。

从图 2 可以看出, 以相似系数 0.57 为标准, 30 份牡丹种质可分为两大聚类群, 第 1 类只包括 1 个品种 (玉楼点翠), 该品种因其花梗长而软, 花朵下垂、枝粗而软、弯曲、株型高大开展等特征独立于其它品种之外, 可能是一份比较特殊的种质材料, 其遗传特

性还有待于进一步研究。第 2 类包括 29 个品种, 又可以分为 2 个亚类: 第 1 亚类包括 3 个品种 (海黄、茶黄和金阁) 均为欧美品种; 第 2 亚类包括 26 个品种, 又可再分为 6 个组: 第 1 组包括 15 个品种 (瓔珞宝珠、春归华屋、藏枝红、桃红献媚、金玉交章、金星雪浪、银粉金鳞、七蕊、彭州紫、夜光白、云芳、天衣、花镜、花王、徽紫), 其中 6 个中原品种 (春归华屋、藏枝红、桃红献媚、金玉交章、金星雪浪、银粉金鳞) 首先相聚在一起; 2 个西南品种 (七蕊、彭州紫) 也首先相聚, 3 个日本品种 (天衣、花镜、花王) 也首先相聚在一起; 第 2 组包括 4 个品种 (玛瑙盘、茶花状



M: Marker ; 1~30: 品种编号同表 1 M: Marker; 1-30: The species codes same as Table 1

图 1 用 P-GAC/M-CAC 引物组合对牡丹的 AFLP 扩增图谱

Fig. 1 AFLP fingerprinting patterns of tree peony using the primer combine of P-GAC/M-CAC

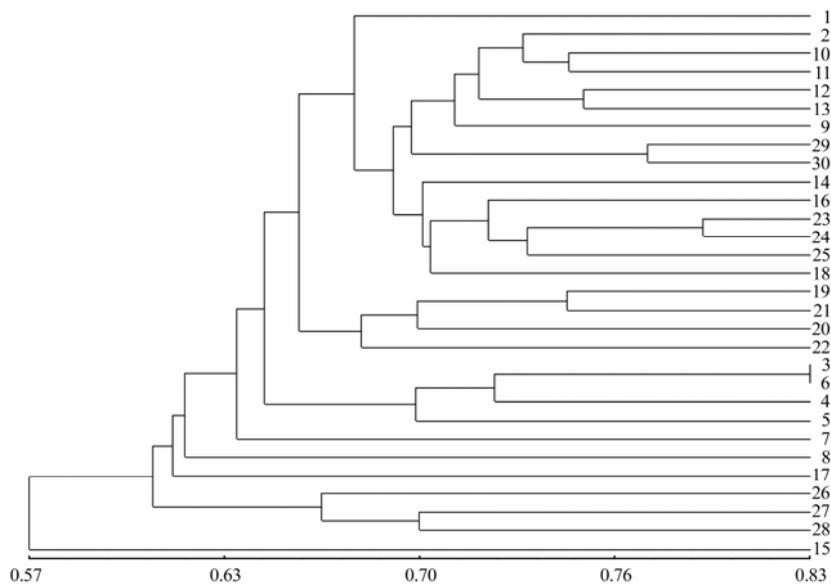


图 2 依据 AFLP 标记的牡丹种质聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis for tree peony based on AFLP markers

元、棕斑白、紫绢), 全部为西北品种; 第 3 组包括 4 个中原品种(蓝田玉、佛门袈裟、小胡红、青山贯雪); 第 4、5 组分别包括 1 个中原品种, 即豆绿和丹炉焰, 而这两个品种各自皆有区别于其它品种的典型生物学特性。如丹炉焰花初开为深红色, 盛开为灰紫色, 蔷薇型, 花期早。豆绿花为黄绿色, 皇冠型, 花期晚。第 6 组包括 1 个江南品种(西施)。由此结果可以看出, 多数来源地相同的种质表现出较为密切的亲缘关系。但也有同一来源地的品种未聚在一起的情况, 如: 江南的 3 个品种, 部分中原品种。从图 2 还可看出, 佛门袈裟和蓝田玉相似系数最高(0.8264), 但它们除了株型方面相似外(都为矮生型品种), 花型、花色、花期都有差异, 而与佛门袈裟花型(蔷薇型)、花期(早)及株型(矮生型)都相似的丹炉焰关系却较远(0.6443)。金星雪浪和夜光白两个品种的花型(皇冠型)、花色(白色)、花期(晚)及株型(中高型)都相似(0.7038), 但他们也没有首先相聚, 而首先与金星雪浪相聚的是金玉交章(0.7523), 二者除花型(均为皇冠型)一致外, 花色、花期、株型都不同。聚类结果还显示, 在第 3 组的 4 个品种中(蓝田玉、小胡红、青山贯雪和佛门袈裟), 除佛门袈裟外, 其余 3 个品种花型都为皇冠型。在供试的 4 个西北品种

中, 花型相同的两个品种玛瑙盘和茶花状元先相聚, 而后再与花型不同的两个品种相聚。这种现象能否说明聚类结果与牡丹品种的性状(如花型)间有一定的相关性, 但多数聚类结果与性状间并未有一致的关系, 还有待于进一步研究。

2.3 AFLP 指纹图谱的特征和不同引物组合的检测效率

8 组引物在 30 个品种中检测到数目不等的品种特异带型(表 3), 可以根据这些品种的特异带型来鉴别牡丹品种。8 组引物品种间的检测效率最高达 83%, 最低为 63%, 平均为 70%。其中, P-GAA/M-CTG、P-GTT/M-CTA、P-GTT/M-CTG 分别能区分其中的 19 份种质, P-GTG/M-CAT、P-GTT/M-CAT 分别能区分其中的 20 份种质, P-GAC/M-CTT 分别能区分其中的 23 份种质, P-GAC/M-CAC 能区分其中的 24 份种质, P-GAC/M-CAA 能区分其中的 25 份种质。引物 P-GAC/M-CAA 分别和 P-GAA/M-CTG、P-GAC/M-CTT、P-GTG/M-CAT 或 P-GTT/M-CTG 任意一组引物结合, 或 P-GAA/M-CTG 与 P-GAC/M-CAC 结合等都能将 30 个牡丹品种完全区分开。因此可以将这些引物组合作为参考来选择鉴别牡丹品种的引物组合。

表 3 品种的特异带型和引物组合的品种间鉴别效率

Table 3 Specific bands and identification, percentage of primer combination for varieties

序号 No.	引物组合 Primer combination	具有某特异带数 Specific bands (present)	缺少某特异带数 Specific bands (absent)	鉴别效率 Identification percentage (%)
1	P-GAA/M-CTG	39	5	63
2	P-GAC/M-CAA	40	7	83
3	P-GAC/M-CAC	43	5	80
4	P-GAC/M-CTT	36	4	77
5	P-GTG/M-CAT	34	4	67
6	P-GTT/M-CAT	30	6	67
7	P-GTT/M-CTA	33	6	63
8	P-GTT/M-CTG	32	7	63
平均 Average		35	5.5	70

3 讨论

本试验利用荧光标记引物 AFLP 方法分析了 30 份牡丹种质的遗传差异, 获得了 86% 的多态性位点。此与陈向明等^[9]、孟丽等^[11]利用 RAPD 标记研究牡丹种质的遗传关系, 分别获得的 80.6%、80.1% 的多态性位点间差异并不十分明显。这可能是由于 AFLP 在扩增出丰富的多态性带的同时也扩增出了大量的单态性

带, 使得其多态性带的百分率并没有明显提高。但平均每对引物所产生的多态性带数(121 条)明显高于前两者(9.91 条、8.50 条)。由此可见, AFLP 标记显然是快速、高效的引物标记。此外, 从 DNA 分子水平上来说, 遗传多样性越高, 表明其遗传背景越复杂, 该物种存在的历史越久远^[17]。高达 86% 的多态性, 说明牡丹在其遗传进化过程中, 基因组 DNA 发生了丰富的变异。同时也揭示了牡丹种质资源极其丰富的

遗传多样性。

聚类图上多数来源地相同的种质表现出较为密切的亲缘关系。这与牡丹野生种源及栽培地生态条件与生态习性等综合因素有关^[18]。但也有同一来源地的品种未聚在一起的情况,如:江南的3个品种,部分中原品种。这种现象可能是因为地区间的引种交流导致了某些基因在不同地区种质之间的渗入^[19],也可能是分子标记方法可反映基因组本质的差异^[20]所致。但仍需今后研究中进行更多的论证。

依据 AFLP 标记的分类与牡丹种质的形态特征间,有的材料具有一定的相关性,但也有的材料外部形态特征差异较大,但却表现出较近的亲缘关系。这种现象能否说明聚类结果与牡丹品种的性状(如花型)间有一定的相关性,但多数聚类结果与性状间并未有一致的关系,还有待于进一步研究。但此与陈向明等^[9]对不同花色牡丹品种亲缘关系的 RAPD-PCR 分析及 Hosoki T 等^[10]对日本 19 个牡丹品种间亲缘关系进行的 RAPD 分析结果有相似之处,陈向明认为,来源相同、花色相同的品种间亲缘关系相对较近,但多数遗传组的划分与花色系列间并未有一致的关系。Hosoki T 等认为,遗传聚类组的划分与花色并不完全一致。这种关系可能与不同的分类水平有关^[21]。传统分类是以某些特殊的形态特征为依据,而分子标记的分类是基于整个基因组 DNA 的多态性检测结果。因此,分类标准的不同可能是导致分类结果不一致的主要原因^[22]。但这些现象还有待于进行更大量的取材进行深入研究。

总之,牡丹种质在长期的自然选择和人工选择下积累了丰富的遗传变异,遗传组成异常复杂,使得某些种类尽管分子标记结果相似系数较高,但植物学形态特征却有较大差异,也有的种类分子标记结果相似系数较低,但仍有可能表现出相似的形态特征。因此,有必要结合形态与分子分类对牡丹种质资源进行更深入的研究,以便为牡丹种质资源利用及品种改良等提供科学依据。

此外,不同生态区牡丹品种间遗传差异相对较大。在进行牡丹杂交育种时,应尽可能选择生态类型差异较大的育种材料,特别是日本、法国及美国的优良种质资源,以使杂交后代有更多机会出现理想的性状组合,培育出更多更好的牡丹新品种。

4 结 论

对牡丹栽培种质资源的 AFLP 分析表明, AFLP

标记能有效地揭示栽培牡丹种质中丰富的遗传多样性。本文利用荧光标记 AFLP 技术,采用 8 对 M+3 和 P+3 引物组合,对 30 份牡丹栽培品种进行了遗传多样性研究。共获得 1123 条可统计的条带,其中 965 条呈多态性,多态性带百分率达 86%。30 份牡丹种质两两间的相似系数分布在 0.52~0.83 之间。8 组引物在 30 个品种中检测到数目不等的品种特异带型,平均获得 40.5 条特异带型(包括具有或缺失某特异带数)。这些品种的特异带型对供试牡丹品种具有一定的鉴别价值。8 对引物能将 30 个牡丹品种完全区分开。可以将这些引物组合作为参考来选择鉴别牡丹品种的引物组合,也可作为利用 AFLP 方法研究其它牡丹种质资源时优先筛选的引物组合。聚类分析结果表明:多数来源地相同的牡丹种质表现出较为密切的亲缘关系,不同生态区牡丹品种间遗传差异相对较大。聚类结果将有利于更好地利用这些丰富的种质资源。

References

- [1] 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,1999,37:351-368.
Hong D Y, Pan K Y. Taxonomical history and revision of *Paeonia* sect. *Moutan* (Paeoniaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1999, 37: 351-368. (in Chinese)
- [2] 王莲英.中国牡丹品种图志.北京:中国林业出版社,1997:52-207
Wang L Y. *Pictorial Record of Chinese Tree Peony Varieties*. Beijing: Chinese Forestry Press, 1997: 52-207. (in Chinese)
- [3] 李嘉珏.中国牡丹品种图志(西北·西南·江南卷).北京:中国林业出版社,2006:63-197
Li J J. *Pictorial Record of Chinese Tree Peony Varieties*. (Volume Xibei Xinan Jiangnan) Beijing: Chinese Forestry Press, 2006: 63-197. (in Chinese)
- [4] 袁 涛,王莲英.根据花粉形态探讨中国栽培牡丹的起源.北京林业大学学报,2002,24(1):5-11.
Yuan T, Wang L Y. Discussion on the origination of Chinese tree-peony cultivars according to pollen grain morphology. *Journal of Beijing Forestry University*, 2002, 24(1): 5-11. (in Chinese)
- [5] 李嘉珏.中国牡丹与芍药.北京:中国林业出版社,1999:98.
Li J J. *Chinese Tree Peony and Paeonia lactiflora*. Beijing: Chinese Forestry Press, 1999: 98. (in Chinese)
- [6] 张赞平,李懋学,袁甲正.牡丹染色体的 Ag-NORs 和 Giemsa C 带研究.武汉植物学研究,1990,8:101-106.
Zhang Z P, Li M X, Yuan J Z. A study on Ag-NORs and giemsa C banding of chromosomes in *Paeonia suffruticosa*. *Journal of Wuhan*

- Botanical Research*, 1990, 8: 101-106. (in Chinese)
- [7] 于玲, 何丽霞, 李嘉珏. 甘肃紫斑牡丹与中原牡丹类群染色体的比较研究. *园艺学报*, 1997, 24(1): 79-83
Yu L, He L X, Li J J. Comparative studies on chromosome in varieties of *Paeonia rockii* and *Paeonia suffruticosa*. *Acta Horticulturae Sinica*, 1997, 24(1): 79-83. (in Chinese)
- [8] 陈道明, 蒋勤. 牡丹品种酯酶同工酶分析. *南京林业大学学报*, 1989, 13(3): 36-42.
Chen D M, Jiang Q. Esterase isozyme analysis of peony varieties. *Journal of Nanjing Forestry University*, 1989, 13(3): 36-42. (in Chinese)
- [9] 陈向明, 郑国生, 孟丽. 不同花色牡丹品种亲缘关系的 RAPD-PCR 分析. *中国农业科学*, 2002, 35: 546-551.
Chen X M, Zheng G S, Meng L. RAPD-PCR analysis of genetic diversity of different color varieties 35 tree peonia cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35: 546-551. (in Chinese)
- [10] Hosoki T, Kimura D, Hasegawa R, Nagasake T, Nishimoto K, Ohta K, Sugiyama M, Haruki K. Comparative study of Chinese tree peony cultivars by random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. *Scientia Horticulturae*, 1997, 70: 67-72.
- [11] 孟丽, 郑国生. 部分野生与栽培牡丹种质资源亲缘关系的 RAPD 研究. *林业科学*, 2004, 40(5): 111-115.
Meng L, Zheng G S. Phylogenetic relationship analysis among Chinese wild species and cultivars of *Paeonia* sect. *Moutan* using RAPD markers. *Scientia Silvae Sinicae*, 2004, 40(5): 111-115. (in Chinese)
- [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: 220-227.
Zou Y P, Cai M L, Wang Z P. Systematic studies on *Paeonia* sect. *Moutan* DC. based on RAPD analysis. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1999, 37: 220-227. (in Chinese)
- [13] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001: 16-17, 108-121.
Zou Y P, Ge S, Wang X D. *Molecular Markers of Plant Systematics and Evolution*. Beijing: Science Press, 2001: 16-17, 108-121. (in Chinese)
- [14] Aggarwal R K, Brar D S, Nandi S, Huang N, Khush G S. Phylogenetic relationship among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 1320-1328.
- [15] Tomkins J P, Wood T C, Barnes L S, Westman A, Wing R A. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Heemerocallis* spp.) using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 489-496.
- [16] Koopman W J M, Zevenbergen M J, Van Den Berg R G. Species relationships in *Lactuca* S.L.(Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *American Journal of Botany*, 2001, 88: 1881-1887.
- [17] 李俊丽, 向长萍, 张宏荣, 杨静. 南瓜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析. *园艺学报*, 2005, 32(5): 834-839.
Li J L, Xiang C P, Zhang H R, Yang J. Analysis of genetic diversity in *Cucurbita* by RAPD Markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32: 834-839. (in Chinese)
- [18] 蓝宝卿, 李嘉珏, 段全绪. 中国牡丹全书. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 93.
Lan B Q, Li J J, Duan Q X. *An Encyclopedia of Tree Peonies in China*. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 2002: 93. (in Chinese)
- [19] 李锡香, 朱德蔚, 杜永臣, 沈镛, 孔秋生, 宋江萍. 黄瓜种质资源遗传多样性及其亲缘关系的 AFLP 分析. *园艺学报*, 2004, 31: 309-314.
Li X X, Zhu D W, Du Y C, Shen D, Kong Q S, Song J P. Studies on genetic diversity and phylogenetic relationship of cucumber (*Cucumis sativus* L.) germplasm by AFLP technique. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31: 309-314. (in Chinese)
- [20] 王志峰, 孙日飞, 孙小镛, 顾兴芳, 曹齐卫, 曲士松. 山东省黄瓜地方品种资源亲缘关系的 AFLP 分析. *园艺学报*, 2004, 31: 103-105.
Wang Z F, Sun R F, Sun X L, Gu X F, Cao Q W, Qu S S. Studies on genetic relationship among local cucumber germplasm of Shandong Province by AFLP analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31: 103-105. (in Chinese)
- [21] 孙万仓, 官春云, 张金文, 孟亚雄, 刘自刚, 张涛, 李梅, 陈社元. 中国芸芥遗传多样性 RAPD 标记分析. *中国农业科学*, 2003, 36: 1248-1253.
Sun W C, Guan C Y, Zhang J W, Meng Y X, Liu Z G, Zhang T, Li X, Chen S Y. Genetic diversity analysis of Yunjie (*Eruca sativa* Mill.) in China by RAPD marker. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36: 1248-1253. (in Chinese)
- [22] 沈镛, 朱德蔚, 李锡香. 云南笋种质资源遗传多样性的 AFLP 分析. *园艺学报*, 2005, 32: 449-453.
Shen D, Zhu D W, Li X X. AFLP analysis of genetic diversity of Taro germplasms in Yunnan Province. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32: 449-453. (in Chinese)