

MOLECULAR DIFFERENTIATION OF PAULOWNIA SPECIES AND HYBRIDS

МОЛЕКУЛЯРНА ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА ГЕНОТИПОВЕ ОТ РОД

Paulownia BYLIANA IVANOVA*, Svetla YANCHEVA and Bojin BOJINOV

Department of Genetics and Plant Breeding, Agricultural University, Plovdiv, Bulgaria *
correspondence, email: bilyana.i@abv.bg

ABSTRACT

Paulownia is the only genus in *Paulowniaceae* family and encompasses several species with similar characteristics. In the last years the interest for industrial use of the genus is rising in Bulgaria in relation to the possibilities for using it as bioenergy source and a raw material for wood industry. Knowledge of the genus however is very limited and poses difficulties even when species and hybrids that are marketed in the country are to be differentiated. Therefore a system for adequate identification of different genotypes is not just of scientific, but of practical interest as well. Due to the lack of adequately described methods for molecular differentiation of the species of *Paulownia* sp. the present study aims at assessing the efficiency of using ISSR markers within this genus and to make an attempt to differentiate the genotypes within the group of species and hybrids, that are available *in vitro* at the Laboratory of Plant biotechnology of the Agricultural University of Plovdiv.

Keywords: ISSR markers, molecular differentiation, *Paulownia*

РЕЗЮМЕ

Пауловнията (*Paulownia*) е единствения род бързорастящи дървета в сем. *Paulowniaceae* и включва в себе си няколко вида със сходни качества. В последните години интересът към промишленото използване на рода у нас се засилва във връзка с потенциалът му като биоенергиен източник и материал за дървообработващата промишленост. Познанията за този род обаче са твърде ограничени дори и на ниво диференциране на отделните видове и хибриди, които се предлагат на пазара у нас. Ето защо наличието на система за адекватно идентифициране на отделните генотипове представлява интерес не само от научен, но и от чисто практически интерес. Поради липсата на адекватно разработени методи за молекулярна диференциация на видовете от род *Paulownia*, настоящото изследване си постави за цел да установи ефективността от използването на ISSR маркери в рамките на род *Paulownia* и да направи опит за диференциация на група генотипове, с които разполага Лабораторията по растителни биотехнологии към Аграрния университет.

Ключови думи: молекулярна диференциация, ISSR маркери, пауловния

Detailed abstract

Present investigation demonstrates the preliminary results of the application of molecular markers for genotype identification within genus *Paulownia*.

Total DNA was isolated from *in vitro* plants of the studied genotypes (Table 1) by PhytoPure extraction kit (AmershamPharmacia).

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) -PCR analysis was performed with ten ISSR primers (Table 2), available at the Laboratory of Molecular Biology.

Results presented in Figure 1 show the quality of the isolated DNA and absence of degradation fragments in all studied genotypes.

Preference for use of ISSR marker system is based on the identification of polymorphism between repeated sequences in the genome of eukaryotic species. The system is relatively simple and inexpensive to develop because it requires only the presence of purified genomic DNA, correct selection of primers and appropriate regime of amplification.

Results from the initial primer screening demonstrated the potential of four ISSR primers to differentiate the studied genotypes.

Analyzing the electrophoretic data with primer E1 (Fig. 2 lanes 2-4) we found that lanes 3 and 4 show identical distribution of fragments with three distinct bands of length – 500 bp, 1000 bp and 1200bp. This is predictable for these two genotypes because of their similar origine (Table 1). Using this primer, lane 2 demonstrates the distribution of three fragments (at 500 bp, 700 bp and 1300 bp respectively). The limited ability of primer E1 is easily explained by closely relations between the second and third genotype.

With primer E3 (Fig2 lanes 5-7) we observed similar results to those with primer E1. Although testing of the studied genotypes with primer E3 gives four distinct fragments it demonstrated the inability to differentiate closely related genotypes. Lanes 6 and 7 showed a similar distribution of four fragments (250 bp, 550 bp, 650 bp and 1100 bp), while lane 5 presented only three bands (350 bp, 500 bp and 1300 bp), which are different.

Analysis of the data with primer E6 (Fig. 2, Lanes 9-11) showed that lanes 9, 10 and 11 have a different distribution of fragments and defined that this primer is able to differentiate even closely related genotypes (Lanes 10 и 11). Start 9 contains bands of 280bp, 350bp and 650bp; start 10 - of 250bp, 310bp, 600bp, 1200bp and 1500bp; start 11 - of 250bp, 310bp, 600bp and 1200bp respectively.

Using primer E10 also gave informative for the purpose of our study results. Figure 2 shows that primer E10 makes it easy to distinguish the three genotypes. Lane 12

shows band of 250bp, 350 bp and 500 bp, start 13 – of 180 bp, 200 bp, 400 bp and 1150 bpq start 14 – of 200 bp, 400 bp and 550 bp.

Analysis of the results presented show thasen marker system (ISSR) is able to differentiate closely related genotypes by detecting differences between them at the DNA level. These genotypic differences encode probably differences in phenotypic manifestation of cerain symptoms, but it can be establish only after further observations in field conditions.

As a result of the present investigation we can conclude that:

The use of molecular markers is an effective method for characterization of the representatives of different genotypes of the genus *Paulownia*.

Our data are basis for further studies toward identification of loci related to economically important characteristics of the culture.

ВЪВЕДЕНИЕ

Пауловнията (*Paulownia*) е единствения род бързорастящи дървета в сем. *Paulowniaceae* (Tank et al., 2006; Kirkham and Fay, 2009). Родът включва в себе си няколко вида, които имат сходни качества и за това за тях се говори под събирателното име пауловния. Всички видове пауловния са бързорастящи дървета. Поради тази им особеност някои от тях като *Paulownia tomentosa*, *Paulownia elongata* и *Paulownia fortunei* се използват за фиторемедиация (Doumett et al., 2008), промишлен добив на дървесина, хартия (Saragós et al., 2008), биомаса, етанол, фураж и други. Родината на пауловнията е Китай, която е и най-големият производител. Дървесината се използва за направата на мебели, строителни конструкции, играчки, шперплат, музикални инструменти и хартия за опаковане. Освен за промишлено отглеждане с цел добив на дървесина, пауловнията се отглежда и като медоносно растение. Тя цъфти обилно, цветовете са богати на нектар, а медът получен от тях - изключително качествен. Обилният цъфтеж, бързият растеж, големите (до 70 см в диаметър) листа, красивата корона и непретенциозността на пауловнията я правят изключително подходяща за парково растение. Видовете от този род са също така подходящи за изграждането на ветрозащитни пояси, възстановяване на опожарени гори и като противоерозионни насаждения.

Познанията за видовете от този род обаче са твърде ограничени (Kumar et al. 1999; Guo-qiang et al., 2001) дори и на ниво диференциране на отделните видове и хибриди. Това важи с особена сила за генотиповете, които се предлагат на пазара у нас. Ето защо наличието на система за адекватно идентифициране на отделните генотипове представлява интерес не само от научен, но и от чисто практически интерес. Използването на съвременните молекулярно-генетични метози за ДНК-базирана идентификация на видове и хибриди *Paulownia* предизвиква определен интерес, макар и засега ограничен в

тесен кръг публикации. В първата известна ни публикация (Wang et al., 1994) са представени молекулярни данни за хибридния произход на *Paulownia taiwaniana*, базирани на RAPD и RFLP маркери от хлоропластна ДНК. Геномна ДНК от *Paulownia fortunei*, *P. kawakamii* и *P. taiwaniana* е амплифицирана с 10-базови праймери за случайни последователности, използвайки полимеразна верижна реакция (PCR). Общо са амплифицирани 351 ДНК фрагмента с помощта на 23 праймера, като от тях 265 фрагмента (75.5%) се оказват полиморфни. Почти всички PCR амплифицирани продукти от *P. taiwaniana* съответстват или на такива от *P. fortunei* или *P. kawakamii*, или на продукти и в двата вида, като броят на полиморфните фрагменти проявени едновременно при *P. taiwaniana* и *P. fortunei* е почти еквивалентен на този проявен едновременно при *P. taiwaniana* и *P. kawakamii*. В същата публикация са анализирани и рестрикционни фрагменти от хлоропластна ДНК (cpDNA), получени от използваните видове *Paulownia* и в реципрочни кръстоски между *P. fortunei* и *P. kawakamii*. Рестрикционните профили, получени с използването на ензима Sall, се оказват идентични за видовете *P. kawakamii* и *P. taiwaniana*. Тези резултати подкрепят хипотезата, че *P. taiwaniana* е естествен хибрид между *P. fortunei* и *P. kawakamii* и, че майчиният родител на *P. taiwaniana* е *P. kawakamii*.

Christina et al., 2003 изследват разпределението на биомасата и способността за образуване на издънки на *Paulownia tomentosa*, при различни нива на осветяване. Аклиматизацията към слаба светлина може да повлияе на способността на дървесните растения да образуват издънки. Разгледани са модели на разпределение на биомасата и способността за образуване на издънки и посадъчен материал от *Paulownia tomentosa* (хелиофилен вид). Растенията са отглеждани под сянката на къщи, в обща градина, с два режима и три степени на осветяване: пълна дневна светлина, изкуствено намалена и сянка. Степените на засенчване са подбрани така, че да наподобяват нивата на осветяване, които са типични за широколистни гори. Изкуствената намалена светлина е междинен режим на осветяване, при който растенията се излагат на пряка слънчева светлина само сутрин и се засенчват след обяд. В експеримента растенията са подрязвани (по 10 дървета) на нивото на земята, като във всеки вариант са използвани различните степени на осветяване по четири пъти през периода на вегетацията. При всички нива на осветяване, растенията са прибирани целорастенийно при всяка дата на подрязване. Растенията от всички варианти разпределят повече подземна биомаса през първите седмици на опита, след което разпределението на биомасата се измества по-нагоре. Растенията, отглеждани на сянка имат по-ниски относителни темпове на растеж (RGR), високи специфични листни площи (SLA) и относителен дял на листната площ спрямо растенията от другите варианти. Способността им да образуват издънки е повлияна от размера на натрупаната подземна биомаса, и тъй като тя е най-малка при отглеждане на сянка, образуването на издънки е най-слабо в този вариант. Увеличената SLA не е била съпътствана с увеличение на RGR. Данните показват, че въпреки че способността за образуване на издънки е зависима от формирането на подземната биомаса, разсадът от *P. tomentosa* може да образува издънки в

ранна възраст, дори при слаба светлина. Тази способност позволява на вида да се установи дори и в области на висока плътност на неприятели.

Kobayashi et al., 2008 извършват проучвания върху морфологията, разпределението, химическите съставки и промените по време на разтварянето на пъпките и развитието на листата на *Paulownia tomentosa*, като характеризират структурите, които предпазват растението от неприятели. Тези проучвания имат за цел да докажат, че определени малки структури по растителната повърхност имат екологични функции като предпазно средство срещу неприятели. Морфологията и разпределението на структурите са изучавани под светлинен микроскоп, а техния химичен състав е анализиран с помощта на тънкослойна хроматография и високо производителна течна хроматография. За по-нататъшно изследване на функциите на тези структури били изследвани три вида от тези структури при *P. tomentosa*: чашевидни органи, грануларни власинки и дендрични трихоми. Оформените чашевидни органи са гъсто агрегирани по листата в близост до цветни пъпки, и са характеризирани като извънцветни нектарници, които отделят захар и привличат мравки. Производството на нектар на тези органи се увеличава при изкуствено нараняване на листата, което предполага предпазна функция срещу неприятели чрез симбиоза с мравки. Грануларните власинки се намират на повърхността на млади листа и/или репродуктивните органи. Тези власинки върху листата, стъблата и цветовете секретират клей, съдържащ глицериди, който клей се използва за хващане на насекомите в капан. Секретите от тези власинки по цветовете и незрелите плодове съдържат флавоноиди, които могат да осигурят защита срещу някои неприятели. Жълтите дендрични трихоми от долната страна на листата също съдържат флавоноиди, идентични с тези секретирани от грануларните власинки по плодовете и цветовете. Три специални вида листа, които се различават от стандартните листа по размер и идентичност на малките структури, се развиват в близост до младите издънки и младите цветни пъпки. Плътността на малките структури по тези видове листа е по-висока отколкото по стандартните листа, което предполага, че тези видове листа могат да бъдат специализирани за защита на младите листа или репродуктивните органи. Промени в малките структури по време на развитието на листа показва, че листата на *P. tomentosa* са основно защитени от грануларните власинки и дендричните трихоми в началните етапи и от EFNs на по-късен етап. Резултатите показват, че *P. tomentosa* защитава своите млади листа и/или репродуктивни органи от неприятели чрез разпределението на малките структури, естеството на които зависи от етапа на развитие на листата и леторастите.

Поради липсата на адекватно разработени методи за молекулярна диференциация на видовете от род *Paulownia*, настоящото изследване си постави следните основни цели:

Да се установи ефективността от използването на молекулярни маркери в рамките на род *Paulownia*.

Да се направи опит за диференциация на отделни генотипове, с които Лабораторията по растителни биотехнологии към Аграрния университет разполага.

За изпълнението на тези цел бяха изпълнени следните задачи:

1. Екстрахиране на ДНК от генотипове от р. *Paulownia*.
2. Провеждане на ISSR-PCR анализ с набор от праймери.
3. Подбор на най-подходящи праймерни комбинации за целите на изследването.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Растителни материали

Като изходен материал за провеждането на настоящото изследване бяха използвани *in vitro* растения от генотипове (Таблица 1), налични към момента в Лабораторията по растителни биотехнологии към Аграрния университет.

Table 1. Description and peculiarities of the studied genotypes
Таблица 1. Описание и особености на проучваните генотипове

Видове и хибридни форми Species and hybrids	Особености Peculiarities
<i>P. tomentosa x P. fortunei</i>	<i>P. tomentosa</i> издържа на студове до -27°C <i>P. fortunei</i> издържа на студове до - 0°C, изключително бързорастяща, висока екологична пластичност <i>P. tomentosa</i> withstands temperatures of -27°C <i>P. fortunei</i> withstands temperatures of - 0°C, extremely fast-growing, adaptability to a wide range of soil types and climates
<i>P. elongata</i>	<i>P. elongata</i> издържа на студове до - 16°C <i>P. elongata</i> withstands temperatures of - 16°C
<i>P. elongata x P. elongata</i>	Сложен хибрид Complex hybrid

Екстракция на ДНК

ДНК беше изолирана от млади, напълно развити листа на *in vitro* растения. Триста милиграма от всяка проба бяха стривани след замразяване в течен азот до получаване на фин светлозелен прах. За изолиране на ДНК беше използван екстракционен кит PhytoPure на AmershamPharmacia.

ISSR-PCR анализът е проведен с помощта на 10 ISSR праймера (Таблица 2), които бяха налични в Лабораторията по молекулярна биология към началото на изследването.

PCR-анализът беше проведен в реакционен обем от 25 µl, като за провеждането на всяка реакция бяха използвани: PCR buffer-2,5 µl; dNTPs -1,5 µl; ISSR primer-1,5 µl; Taq-0,12 µl; H₂O -18,38 µl; 1µl геномна ДНК.

Table 2. Sequences of the ISSR primers used

Таблица 2. Последователности на използваните ISSR праймери.

Наименование на праймера	ДНК последователност	Дължина (нд)
Primer name	DNA sequence	Length (bp)
E 1	(CA) ₈ AA+GG	20
E 2	(CA) ₈ AA+GC+T	21
E 3	(GA) ₈ C+TC	19
E 4	(AG) ₈ C+TC	19
E 5	(AC) ₈ C+TA	19
E 6	(AC) ₈ C+TG	19
E 7	(AG) ₈ C+TG	19
E 8	(AC) ₈ C+TT	19
E 9	(AG) ₈ C	17
E 10	(GA) ₈ T	17

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

ДНК екстракция

В началото на вегетацията бяха подбрани растения и от тях беше изолирана и пречистена ДНК с помощта на стандартния набор химикали на Amersham-Pharmacia (PhytoPure DNA extraction kit). Резултатите, представени на Фигура 1 показват, че получената при екстракцията ДНК от всеки един генотип е със сходно качество (липса на деградирани фрагменти) и в приблизително еднакви количества.

Изследването продължи с прилагането на маркерна система, която да бъде в състояние ефективно да идентифицира и възпроизводимо да представя съществуващите различия между генотиповете на ниво наследствен материал (ДНК).

ISSR анализ

Наличните предварителни данни предопределиха използването на система, която да е в състояние да идентифицира едновременно голям брой локуси, макар и без да може първоначално да бъде определена тяхната точна хромозомна локализация. Това обаче не е и необходимо за целите на настоящото изследване. Достатъчно е да могат да бъдат идентифицирани използваните генотипове по един надежден и високо възпроизводим между различни лаборатории начин.

Предпочетената за използване от нас маркерна система се базира на идентифицирането на полиморфизми между повторените последователности в генома на еукариотните видове (Inter-Simple Sequence Repeats – ISSRs). Системата е относително проста и евтина за разработване, тъй като изисква само наличието на пречистена геномна ДНК, правилен подбор на праймери и подходящ режим на амплификация.

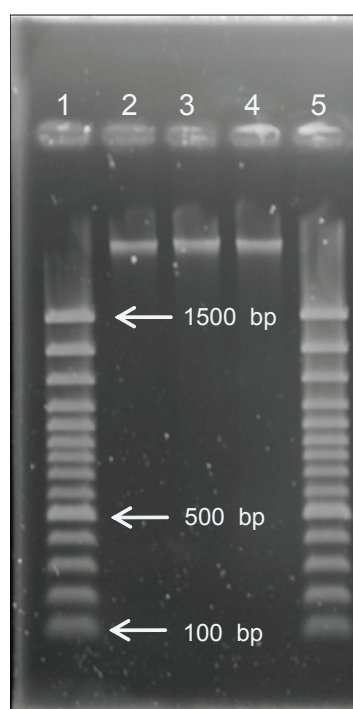


Figure 1. Results from total genomic DNA extraction from young leaves of the selected genotypes. Lanes 1 and 5 – standard DNA; Lane 2 – *P. tomentosa* x *P. fortunei*; Lane 3 – *P. elongata* x *P. elongata*; Lane 4 – *P. elongata*

Фигура 1. Резултати от екстракцията на тотална геномна ДНК от млади листа на изследваните генотипове. Стартове 1 и 5 — стандартна ДНК, Старт 2 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, Старт 3 - *P. elongata* x *P. elongata*, Старт 4 - *P. elongata*.

Резултатите от първоначалното скриниране демонстрираха потенциала на 4 от избраните ISSR праймери да диференцират генотиповете в рамките на рода. Останалите 6 използвани ISSR праймера не дадоха задоволителни резултати и не бяха използвани по-нататък.

При изследването на генотиповете с праймер E1 (фиг. 2, стартове 2-4), беше установено, че стартове 3 и 4 показват идентично разпределение на фрагментите с три ясно различими ивици с дължина 500bp, 1000bp и 1200bp. Това от своя страна е логично за тези два генотипа, тъй като те имат сходен произход (Таблица 1). При анализа на електрофоретичните данни от използването на този праймер старт 2 показва разпределение на фрагментите с три ивици (на 500bp, 700bp и 1300bp). Също така беше установено, че с използването му може да се отдиференцира първия генотип от останалите два, което беше и една от целите на нашето изследване. Ограничената способност на праймер E1 е лесно обяснима с близкородствените отношения между втория и третия генотип.

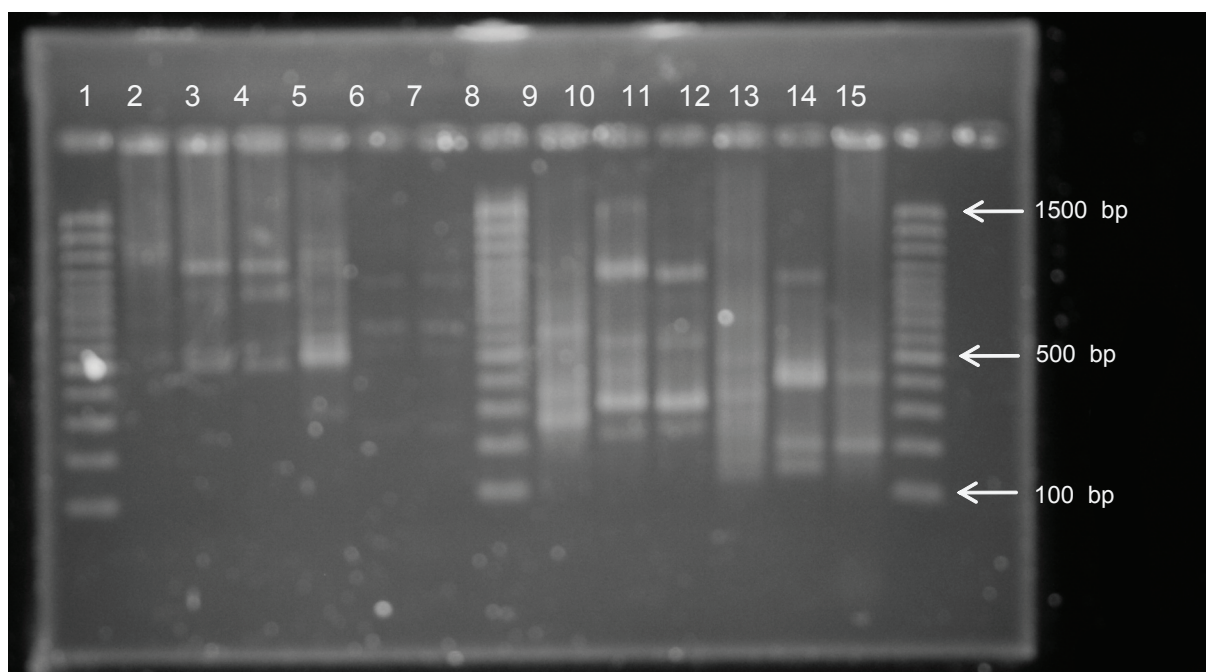


Figure 2. Results from testing 3 genotypes with 4 ISSR primers (E1, E3, E6, E10). Lanes 1, 8 and 15 - standard DNA; 2, 3 and 4 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* with primer E1; 5, 6 and 7 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* with primer E3; 9, 10 and 11 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* with primer E6; 12, 13 and 14 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* with primer E10;

Фигура 2. Резултати от изследването на 3-те генотипа, използвайки 4 ISSR праймера (E1, E3, E6, E10). Стартове 1, 8 и 15 - Стандартна ДНК; 2, 3 и 4 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* с праймер E1; 5, 6 и 7 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* с праймер E3; 9, 10 и 11 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* с праймер E6; 12, 13 и 14 - *P. tomentosa* x *P. fortunei*, *P. elongata*, *P. elongata* x *P. elongata* с праймер E10;

При използването на праймер E3 (фиг. 2, стартове 5-7) бяха получени сходни резултати с тези, получени с праймер E1. Въпреки, че тестването на

изучаваните генотипове с праймер E3 дава четири ясно различни фрагмента, използването на този праймер отново не беше в състояние да диференцира близкородствените генотипове. При провеждането на този анализ стартове 6 и 7 показват идентични резултати, докато при старт 5 наблюдаваме известни различия. Стартове 6 и 7 показват сходно разпределение на фрагментите с четири ивици (на 250bp, 550bp, 650bp и 1100bp), поради което не могат да бъдат разграничени един от друг. При старт 5 се наблюдават три ивици (на 350bp, 500bp и 1300bp), които са с различни размери от предходните два старта (6 и 7). Това от своя страна ни дава възможност да отдиференцираме този генотип от останалите два. По-нататъшните изследвания продължиха с използването на праймери E6 и E10. Провеждането на реакция с праймер E6 (фиг. 2, стартове 9-11) показва, че стартове 9, 10 и 11 имат различно разпределение на фрагментите, и че праймерът е в състояние да диференцира дори близкородствените генотипове (старт 10 и 11). При старт 11 липсва най-горната ярка ивица с размер 1500bp, която е лесно различима на старт 10. Старт 9 съдържа ивици на 280bp, 350bp и 650bp; старт 10 - на 250bp, 310bp, 600bp, 1200bp и 1500bp; старт 11 - на 250bp, 310bp, 600bp и 1200bp. Използването на праймер E10, също даде информативни за целите на нашето изследване резултати. На фигурата се вижда, че праймер E10 позволява лесното разграничаване на трите генотипа. Старт 12 показва ивици на 250bp, 350bp и 500bp; старт 13 - на 180bp, 200bp, 400bp и 1150bp; старт 14 - на 200bp, 400bp и 550bp.

Заклучение

Анализът на представените резултати показва, че избраната от нас маркерна система (ISSR) е в състояние да диференцира близкородствени генотипове чрез детекция на разликите помежду им на ниво наследствен материал. До колко обаче тези генотипни различия могат да бъдат свързани с различия във фенотипното проявление на определени признаци може да бъде установено едва след по-нататъшни наблюдения в полски условия и фенотипиране на индивидите, от които беше взет материал за екстракция на ДНК. Това следва да

бъде предмет на едно бъдещо проучване, което също така да се обогати и с използването на други маркерни системи.

В резултат от получените данни и направения анализ могат да бъдат направени следните изводи:

Използването на молекулярни маркери е ефективен метод за диференциация на представителите на различни генотипове от р. *Paulownia*.

Избраната маркерна система (ISSR) дава възможност за установяване на различия дори между близкородствени генотипове (*P. elongata* от хибрида *P. elongata* x *P. elongata*).

Получените данни са добра основа за бъдещи изследвания в посока идентификация на локуси, свързани със стопански ценни признаци при тази култура.

References

- Caparrós S., M.J. Díaz, J. Ariza, F. López and L. Jiménez. “New perspectives for *Paulownia fortunei* L. valorisation of the autohydrolysis and pulping processes”. *Bioresource Technology* (2008) 99(4): 741 – 749
- Christina, A., W. Longbrake and Brian C. McCarthy. “Biomass Allocation and Resprouting Ability of Princess Tree (*Paulownia tomentosa*: Scrophulariaceae) Across a Light Gradient”. *Am. Midl. Nat.* (2003) 146:388–403
- Doumett, S., L. Lamperi, L. Checchini, E. Azzarello, S. Mugnai, S. Mancuso, G. Petruzzelli and M. Del Bubba. “Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: Influence of different complexing agents”. *Chemosphere* (2008) 72(10): 1481 - 1490
- Guo-qiang, Fan, Peng Hai-feng and Zhai Xiao-giao. “Protein diversity of *Paulownia* plant leaves and clusters”. *Journal of Forestry Research* (2001) 12(1):21-24
- Kobayashi, Sawa, Teigo Asai, Yoshinori Fujimoto and Shiro Kohshima. “Anti-herbivore Structures of *Paulownia tomentosa*: Morphology, Distribution, Chemical Constituents and Changes During Shoot and Leaf Development”. *Annals of Botany* (2008) 101: 1035–1047
- Kirkham, Tony and Michael F. Fay. “PAULOWNIA KAWAKAMII”. *Curtis’s Botanical Magazine* (2009) 26(1&2): 111–119
- Kumar, Prakash, C. Dimps Rao, G. Rajaseger and A. Rao. “Seed Surface Architecture and Random Amplified Polymorphic DNA Profiles of *Paulownia fortunei*, *P. tomentosa* and their Hybrid”. *Annals of Botany* (1999) 83(2): 103-107

Tank, D.C., Beardsley, P.M., Kelchner, S.A. and Olmstead, R.G. "Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition". Australian Systematic Botany (2006) 19: 289–307

Wang, W. Y., R. C. Pai, C.C. Lai, T. P. Lin. "Molecular evidence for the hybrid origin of Paulownia Taiwaniana based on RAPD markers and RFLP of chloroplast DNA". Theor. Appl. Genet. (1994) 89:271–275