

观赏石榴表型遗传多样性分析

火艳¹, 招雪晴², 黄厚毅³, 黄贤斌², 许云方², 祝遵凌^{1,3}, 苑兆和^{1,2}

(1. 南京林业大学 风景园林学院 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037; 3. 南京林业大学 艺术设计学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 【目的】探究观赏石榴 *Punica granatum* 表型遗传多样性, 为中国观赏石榴种质资源的鉴定与评价提供理论依据。【方法】对 24 个观赏石榴品种的株型、枝型、花色、花的尺寸、花瓣数、瓣化雄蕊数等 13 个观赏性状进行表型调研与多样性分析, 在此基础上进行主成分分析与聚类分析, 并利用流式细胞仪对 24 个品种进行倍性及 C 值测定。【结果】多样性指数检测发现: 观赏石榴数量性状 (1.715) 大于质量性状 (1.148), 质量性状中花瓣色、花萼色、花型、1 年生小枝颜色的多样性指数较大。数量性状中瓣化雄蕊数和花瓣数的变异系数分别为 117.59% 和 78.86%, 表现出丰富的表型多样性, 说明花瓣数增多、雄蕊瓣化是观赏石榴的选育方向。瓣化雄蕊数和花瓣数的多样性指数变化趋势与变异系数变化趋势不一致, 说明其变异范围很大, 且变异分布不均匀。主成分分析结果表明: 前 4 个主成分特征值均大于 1, 累计贡献率达 80.10%, 枝的形态与颜色、花大小、花瓣数及花瓣形成、株型、花色是造成观赏石榴表型差异的主要影响因素。聚类分析表明: 供试的 24 个观赏石榴品种可分为 3 个组群, 其遗传聚类与花型、颜色、株型关系密切。橙色花品种与粉色花品种、白色花品种的亲缘关系较近, 与复色花品种的亲缘关系较远。单瓣品种与所有的复瓣品种、大部分重瓣品种的亲缘关系较近, 小部分重瓣品种与台阁品种的亲缘关系较近, 与主流的花型演化观点一致。流式细胞仪分析表明: 24 个观赏石榴均为二倍体, 说明石榴品种遗传稳定。【结论】观赏石榴表型多样性丰富, 测试品种均为二倍体。图 1 表 8 参 48

关键词: 园艺学; 石榴; 观赏品种; 表型多样性; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: S685.99; Q949.99 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2020)05-0939-11

Phenotypic genetic diversity of ornamental pomegranate cultivars

HUO Yan¹, ZHAO Xueqing², HUANG Houyi³, HUANG Xianbin²,
XU Yunfang², ZHU Zunling^{1,3}, YUAN Zhaohe^{1,2}

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 3. College of Arts & Design, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] This paper is aimed to explore the phenotypic and diversity of ornamental pomegranate and provide theoretical basis for the identification and evaluation of ornamental pomegranate resources in China. [Method] With 24 ornamental pomegranate cultivars selected, an investigation was conducted of their 13 ornamental features such as plant form, branch type, flower color, flower size, number of petal and number of petaloid stamens with an analysis of the diversity. Then, based on these indexes, principal component

收稿日期: 2019-10-21; 修回日期: 2020-05-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770752); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20180768); 江苏省高校优势学科建设工程项目 (PAPD); 江苏省“333 工程”项目 (BRA2018065); 江苏省科技支撑计划项目 (BM2013478); 南京林业大学高层次人才科研启动基金项目 (GXL2014070, GXL2018032)

作者简介: 火艳, 博士研究生, 从事园林植物栽培与遗传育种研究。E-mail: yanhuo@njfu.edu.cn。通信作者: 祝遵凌, 教授, 博士生导师, 从事园林植物栽培与应用研究。E-mail: zhuzunling@njfu.edu.cn。苑兆和, 教授, 博士生导师, 从事经济林与果树遗传育种研究。E-mail: zhyuan88@hotmail.com

analysis and cluster analysis were carried out, while the ploidy and *C*-value of 24 cultivars were determined by flow cytometry(FCM). [Result] (1) The ornamental pomegranate varieties were rich in phenotypic diversity, the morphological diversity index of quantitative trait (1.715) was greater than that of qualitative trait (1.148), and the coefficient of variation of the number of petaloid stamens and petals was 117.59% and 78.86%, respectively, indicating that the increasing number of petals and stamen petalization were the breeding directions of ornamental pomegranate. (2) The variation trend of diversity index of petalized stamen number and petal number was not consistent with that of the variation coefficient, implying that the variation range was large and the variation distribution was uneven. (3) The characteristic values of the first four principal components were greater than 1.00, and the cumulative contribution rate reached 80.10% while the shape and color of branches, flower size, petal number, petal formation, plant form and flower color were the main factors affecting the phenotype differences of ornamental pomegranate. (4) The 24 ornamental pomegranate cultivars could be divided into three groups with their genetic clustering closely related to flower pattern, color and plant type: orange flower cultivars were much more closely related to pink and white flower cultivars than multicolor flower cultivars and single petal cultivars were closely related to all double petal cultivars and most double petal cultivars, while a small number of double petal cultivars were closely related to proliferation flower cultivars, which was consistent with the mainstream view of flower type evolution. (5) All ornamental pomegranate cultivars were diploids, indicating that pomegranate cultivars were genetically stable. [Conclusion] The phenotypic diversity in ornamental pomegranate was rich, and all the tested cultivars were diploid. [Ch, 1 fig. 8 tab. 48 ref.]

Key words: horticulture; pomegranate; ornamental cultivars; phenotypic diversity; principle component analysis; clustering analysis

石榴 *Punica granatum* 是千屈菜科 Lythraceae 石榴属 *Punica* 落叶小乔木或灌木, 在中国约 2 000 a 的栽培史, 200 余个品种^[1-2]。常分为食用石榴和观赏石榴, 观赏石榴株型优美, 花期长, 花色艳, 春叶红、秋叶黄, 果实奇特, 可观性果实宿存树体时间长, 是春、夏、秋 3 季可赏的重要花木, 广泛应用于园林绿化、盆栽、盆景等^[2-3]。目前国内外的研究主要集中于利用分子标记对石榴种质资源遗传多样性的分析和评价^[4-11], 以及对食用石榴果实形态及生化指标的测定分析^[12-17], 对观赏资源的遗传多样性研究较少。MARTINEZ-NICOLAS 等^[18]对 53 个西班牙品种的果实、种子、叶、花等性状进行过表型研究, 但没有针对树型、枝型、花型、瓣化雄蕊数等观赏性状的综合分析。陈俊愉等^[19]根据株型、花、果、叶片大小将国内观赏石榴分为花石榴和果石榴, 其中花石榴分为一般种与矮生种, 再依据花色和单、重瓣分类。汪小飞^[20]将包括观赏石榴在内的全国 87 个石榴品种分为单瓣、复瓣、重瓣、台阁 4 个品种群。王庆军等^[21]对 35 份种质资源进行了表型性状的初步调查, 但未对表型性状多样性及亲缘关系进行综合评价。表型多样性是遗传多样性与观赏植物评价的重要基础, 全面了解石榴种质的优异性状, 可为石榴种质资源的鉴定、保存和推广提供参考。*C* 值指生物体单倍体细胞核的 DNA 总质量, *C* 值的变异对研究物种的亲缘关系以及系统发育具有重要意义, 结合倍性水平分析也可用来鉴定杂交物种^[22]。目前中国石榴品种‘泰山红’‘Taishanhong’大笨籽’‘Dabenzi’和‘大籽’‘Dazi’被鉴定为二倍体, 美国品种‘Nana’为四倍体^[23-25]。多倍体植物具有花大、果实大、植株健壮、抗逆性强等优点, 是育种的好材料。流式细胞术作为快速准确测定倍性与基因组含量的先进技术, 可为石榴种质资源的创新与遗传育种提供理论基础。本研究对 24 个观赏石榴品种的株型、枝型、花型、1 年生小枝颜色、花瓣色、花萼色、花长、花宽、花萼长、花萼宽、花萼瓣数、花瓣数、瓣化雄蕊数等 13 个观赏性状进行了表型多样性分析、主成分分析与聚类分析, 并利用流式细胞仪对 24 个品种进行了倍性及 *C* 值测定, 为观赏石榴种质资源的评价、创新与遗传育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为生长良好且无病虫害的 24 个观赏石榴品种 (表 1), 其中单瓣品种群 (single-flower group) 8 个、复瓣品种群 (semi-double-flower group) 4 个、重瓣品种群 (double-flower group) 11 个、台阁品种群 (proliferation-flower group) 1 个。

表 1 24 个观赏石榴品种名称及来源

Table 1 List of 24 ornamental pomegranate cultivars

序号	品种名	类型	引种地
1	‘泰安红牡丹’‘Taianhongmudan’	重瓣	中国山东
2	‘榴缘白’‘Double red-white’	台阁	美国
3	‘青皮月季’‘Qingpiyueji’	重瓣	中国山东
4	‘峯城重瓣红皮酸’‘Yichengchongbanhongpisuan’	重瓣	中国山东
5	‘峯城粉红牡丹’‘Yichengfenghongmudan’	复瓣	中国山东
6	‘峯城红花重瓣紫皮酸’‘Yichenghonghuachongbanzipisuan’	复瓣	中国山东
7	‘榴花雪’‘Hakubatan’	重瓣	美国
8	‘峯城粉红重瓣白皮甜’‘Yichengfenghongchongbanbaipitian’	重瓣	中国山东
9	‘峯城重瓣玛瑙’‘Yichengchongbanmanao’	重瓣	中国山东
10	‘洛阳白马寺’‘Luoyangbaimasi’	重瓣	中国河南
11	‘礼泉重瓣红花青皮酸’‘Liquanchongbanhonghuaqingpisuan’	重瓣	中国陕西
12	‘峯城重瓣白花酸’‘Yichengchongbanbaihuasuan’	复瓣	中国山东
13	‘峯城单瓣粉红酸’‘Yichengdanbanfenghongsuan’	单瓣	中国山东
14	‘榴花红’‘Nochi-shibori’	重瓣	美国
15	‘紫皮甜’‘Zipitian’	单瓣	中国山东
16	‘峯城单瓣粉红甜’‘Yichengdanbanfenghongtian’	单瓣	中国山东
17	‘突尼斯软籽软枝’‘Tunisiruanziruanzhi’	单瓣	突尼斯
18	‘墨石榴’‘Moshiliu’	单瓣	中国山东
19	‘宫灯石榴’‘Gongdengshiliu’	单瓣	中国山东
20	‘泰山红’‘Taishanhong’	单瓣	中国山东
21	‘南林重瓣红’‘Nanlinchongbanhong’	重瓣	中国江苏
22	‘南林单瓣红’‘Nanlindanbanhong’	单瓣	中国江苏
23	‘南林重瓣白’‘Nanlinchongbanbai’	复瓣	中国江苏
24	‘南林重瓣玛瑙’‘Nanlinchongbanmanao’	重瓣	中国江苏

1.2 方法

1.2.1 观赏性状测定 试验于 2018 年 5 月在中国石榴种质资源圃 (峯城) 和南京林业大学进行, 每品种随机选择 3 株生长健壮、无病虫害、长势一致的植株进行各表型性状的调查和统计。其中质量性状 6 个: 株型 (plant form, PF)、枝型 (branch type, BT)、花型 (flower pattern, FP)、1 年生小枝颜色 (color of branch, BC)、花瓣色 (color of petal, PC)、花萼色 (color of sepal, SC)。数量性状 7 个: 花长 (flower length, FL)、花宽 (flower diameter, FD)、花萼长 (sepal length, SL)、花萼宽 (sepal diameter, SD)、花萼瓣数 (number of sepals, NOS)、花瓣数 (number of petals, NOP)、瓣化雄蕊数 (number of petaloid stamens, NOPS)。用直尺或游标卡尺测量长度, 小数点后保留 2 位有效数; 用国际通用的英国皇家园艺学会比色卡 (RHSCC) 测量颜色, 记录数字编码。调查取样标准根据《植物新品种特异性、一致性、稳定性测试指南 石榴属》的操作进行^[26]。

1.2.2 C 值与倍性鉴定 以二倍体石榴 ‘大笨籽’ 为外标, 选用 LB01 解离液。滤网、荧光染料、鞘液、培养皿、试剂均购自南京博巧生物技术有限公司。分别取各石榴品种嫩叶, 用流式细胞仪 (Influx, 美国 BD 公司) 测定倍性与 C 值, 具体参照林峰等^[27] 方法进行。

1.3 数据处理

1.3.1 观赏性状数据处理 质量性状均以 1~6 级进行分级和赋值 (表 2), 数量性状根据平均值 (X) 和标准差 (δ) 分为 10 级, 1 级 $< X-2\delta$, 10 级 $\geq X+2\delta$, 中间每级相差 0.5δ ^[28-29]。各性状的遗传多样性采用 Shannon's 信息指数 (H') 进行评价: $H' = -\sum(P_i)(\ln P_i)$, 其中 P_i 表示第 i 种变异类型出现的频率^[30]。采用 Excel 进行性状数据 (平均值、最大值、最小值、极差和变异系数等) 的基本统计。使用 SPSS 24.0 软件计算表型数据的 KMO 检验值及 Bartlett 球形度检验的显著性。种质间距为平方欧式距离, 聚类方法采用 Ward 法。

表 2 观赏石榴品种质量性状描述分级

Table 2 Description and grouping of qualitative characters of ornamental pomegranate cultivars

分级	株型	枝型	花型	1年生小枝颜色	花瓣色	花萼色
1	乔木状	直立	复瓣	粉红	白色	浅黄
2	矮生	开张	单瓣	玫红	橙黄	黄色
3		垂枝	重瓣	紫红	橙红	浅橙黄
4			台阁	浅棕	红色	橙黄
5				浅绿	粉红	橙红
6					复色	红色

1.3.2 C 值及倍性数据处理 荧光染料 PI 的激发波长为 488 nm, 收集通道为 FL2(670 nm \pm 30 nm), 检测 PI 的发射荧光强度。使用 Influx 自带软件 FACSTM Software 进行分析。‘大笨籽’基因组大小为 328 Mbp^[23], C 值为 0.33 pg, 根据公式^[31]: 待测样本的细胞核 DNA 含量或倍性=对照样本细胞核 DNA 含量或倍性 \times (待测样本 G₀/G₁ 峰荧光强度/对照样本 G₀/G₁ 峰荧光强度)。变异系数 (V_C) 控制在 8% 以内。

2 结果与分析

2.1 观赏石榴质量性状多样性

根据表 2 对观赏石榴品种的 6 个主要质量性状进行分级和赋值, 统计各性状的频率分布和多样性指数, 由表 3 可知: 各性状多样性指数为 0.512~1.683, 平均为 1.148。多样性指数最大的性状为花瓣色, 其次为花萼色、花型和 1 年生小枝颜色, 多样性指数均大于 1.000; 其中, 花瓣色以橙黄 (25.00%)、橙红 (25.00%) 为主, 花萼色以橙黄 (41.67%) 为主, 花型以重瓣为主 (45.83%), 1 年生小枝颜色以粉红 (62.50%) 为主。多样性指数最小的性状是株型, 其次是枝型; 其中, 株型主要为乔木型 (79.17%), 枝型主要为开张型 (58.33%)。

表 3 观赏石榴品种质量性状频率分布及多样性

Table 3 Frequency distribution and diversity of qualitative characteristics of ornamental pomegranate cultivars

性状	频率/%						多样性指数(H')
	1级	2级	3级	4级	5级	6级	
株型	79.17	20.83					0.512
枝型	37.50	58.33	4.17				0.815
花型	33.33	16.67	45.83	4.17			1.155
1年生小枝颜色	62.50	4.17	8.33	8.33	16.67		1.139
花瓣色	16.67	25.00	25.00	4.17	16.67	12.50	1.683
花萼色	8.33	16.67	8.33	41.67	8.33	16.67	1.583

2.2 观赏石榴数量性状多样性

24 个观赏石榴的 7 个数量性状表现了广泛的变异, 变异系数为 11.76%~117.59%(表 4), 多样性指数为 1.456~1.910, 多样性指数平均为 1.715, 高于质量性状, 说明观赏石榴数量性状多样性更丰富。7 个性状中瓣化雄蕊数的变异系数最大, 达 117.59%, 花瓣数次之, 为 78.86%, 而花萼瓣数、花长、花萼长

表 4 观赏石榴品种数量性状统计

性状	花长/cm	花宽/cm	花萼长/cm	花萼宽/cm	花萼瓣数/片	花瓣数/片	瓣化雄蕊数/片
平均值	4.43±0.61	4.70±1.25	3.09±0.57	3.60±0.92	6.48±0.76	41.94±33.08	57.11±67.15
最大值	5.42	6.43	4.11	4.87	8	134	276.67
最小值	3.03	2.33	1.63	2.00	5	6	0
变异系数/%	13.85	26.60	18.40	25.64	11.76	78.86	117.59

的变异系数较小。多样性指数最大的性状是花萼长 (1.910)，其次是花长 (1.906)、花宽 (1.802)、花萼宽 (1.683)、花瓣数 (1.630)、花萼瓣数 (1.619)、瓣化雄蕊数 (1.456)，多样性指数均大于 1.600。

2.3 不同观赏石榴种群表型多样性比较

根据汪小飞^[20]方法将观赏石榴品种划分为 3 个种群，即单瓣种群、复瓣种群、重瓣种群。由表 5 可知：3 个种群的表型性状多样性指数分别为 0.813、0.600 和 1.157，其平均多样性指数为 0.856，表明不同观赏石榴种群之间，表型性状的多样性指数均有不同程度的差异。其中，重瓣种群表型多样性指数最高，除枝型外，其他 12 个性状均高于所有品种相应性状的平均值，特别是花瓣数、瓣化雄蕊数、花萼宽、花宽和 1 年生小枝颜色。单瓣种群的株型、枝型、1 年生小枝颜色、花萼色、花长和花萼宽的多样性指数均高于所有品种相应性状的平均值。由此可见：3 个种群中，重瓣种群的表型性状遗传多样性最丰富，其次是单瓣种群，复瓣种群的表型遗传多样性最低。

表 5 不同观赏石榴种群形态多样性指数

性状	单瓣种群	复瓣种群	重瓣种群	平均值	性状	单瓣种群	复瓣种群	重瓣种群	平均值
株型	0.562	0.000	0.586	0.383	枝型	0.974	0.562	0.689	0.742
花型	0.000	0.000	0.000	0.000	1年生小枝颜色	0.900	0.693	1.030	0.874
花瓣色	1.082	1.040	1.720	1.281	花萼色	1.321	1.040	1.290	1.217
花长	1.560	1.040	1.666	1.422	花宽	0.900	0.562	1.295	0.919
花萼长	1.321	1.040	1.673	1.344	花萼宽	0.974	0.562	1.067	0.868
花萼瓣数	0.974	0.693	1.594	1.087	花瓣数	0.000	0.000	1.264	0.421
瓣化雄蕊数	0.000	0.562	1.162	0.575	平均值	0.813	0.600	1.157	0.856

2.4 观赏石榴表型多样性的主成分分析

供试观赏石榴表型性状的 KMO 检验值为 0.622(高于 0.600)，Bartlett 球形度检验显著性为 0.000(低于 0.050)，符合主成分分析条件。以特征值大于 1 为标准提取主成分，前 4 个主成分的累计贡献率为 80.10%，认为这 4 个主成分能充分反映 13 个表型性状(表 6)。第 1 主成分的特征值为 4.52，贡献率为 34.74%，特征向量绝对值较大的为枝型、1 年生小枝颜色、花长、花萼宽，说明第 1 主成分是枝的形态颜色与花大小的综合反映。第 2 主成分的特征值为 2.62，贡献率为 20.17%，特征向量绝对值较大的为花型、株型、瓣化雄蕊数，说明第 2 主成分是花瓣数及花瓣形成、株型的综合反映。第 3 主成分的特征值为 2.06，贡献率为 15.82%，特征向量绝对值较大的为花瓣数、花萼瓣数、花瓣色，说明第 3 主成分是花瓣数、花大小、花色的综合反映。第 4 主成分的特征值为 1.22，贡献率为 9.39%，特征向量绝对值较大的为花萼长，说明第 3 主成分是花大小的综合反映。由此得出：枝的形态与颜色、花大小、花瓣数及花瓣形成、株型、花色是造成观赏石榴表型差异的主要影响因子。

2.5 观赏石榴表型多样性的聚类分析

根据表型性状和主成分分析结果进行变量筛选，单因素方差分析发现：对聚类贡献较大的变量为花萼长、花萼瓣数、花瓣数、瓣化雄蕊数、株型、枝型、花型、1 年生小枝颜色和花瓣色 9 个指标，构建聚类图(图 1)。在遗传距离为 11~12 时，观赏石榴品种分为 3 个组群：组群 I、组群 II、组群 III。其中，组群 I 包括 6 个重瓣种群和 4 个复瓣种群；组群 II 包括 8 个单瓣种群和 1 个重瓣种群；组

表 6 观赏石榴品种多样性的主成分分析

Table 6 Principle component analysis of morphological diversity of ornamental pomegranate cultivars

性状	主成分				性状	主成分			
	PC1	PC2	PC3	PC4		PC1	PC2	PC3	PC4
株型	0.16	-0.48	0.21	-0.24	枝型	0.43	0.07	-0.14	-0.09
花型	0.10	-0.53	0.20	-0.13	1年生小枝颜色	0.43	0.00	-0.22	-0.02
花瓣色	0.25	0.17	0.42	0.02	花萼色	0.39	0.14	-0.23	0.12
花长	0.41	-0.11	0.13	0.11	花宽	-0.11	0.29	-0.32	-0.36
花萼长	0.01	0.00	0.09	0.81	花萼宽	0.42	0.08	-0.25	-0.04
花萼瓣数	-0.10	-0.24	-0.42	0.33	花瓣数	0.14	0.18	0.43	0.03
瓣化雄蕊数	0.01	0.48	0.27	-0.03	特征值	4.52	2.62	2.06	1.22
累积贡献率/%	34.74	20.17	15.82	9.39	累积贡献率/%	34.74	54.91	70.73	80.12

群Ⅲ包括4个重瓣品种群和1个台阁品种群。在遗传距离14~15时，组群Ⅰ和组群Ⅱ聚在一起，说明组群Ⅰ和组群Ⅱ遗传关系较近，两者与组群Ⅲ的遗传关系均较远。进一步分析，4个白花类品种(‘峰城重瓣白花酸’‘南林重瓣白’‘洛阳白马寺’‘榴花雪’)聚在一起，1年生小枝颜色为浅绿色的品种也都是白花品种，全部聚在一起，说明白花品种的遗传关系较近。3个复色品种(‘榴缘白’‘峰城重瓣玛瑙’‘南林重瓣玛瑙’)也聚在一起。除了‘青皮月季’以外，4个矮生品种(‘榴花雪’‘榴花红’‘墨石榴’‘宫灯石榴’)聚在一起，表明矮生品种间遗传关系较近。

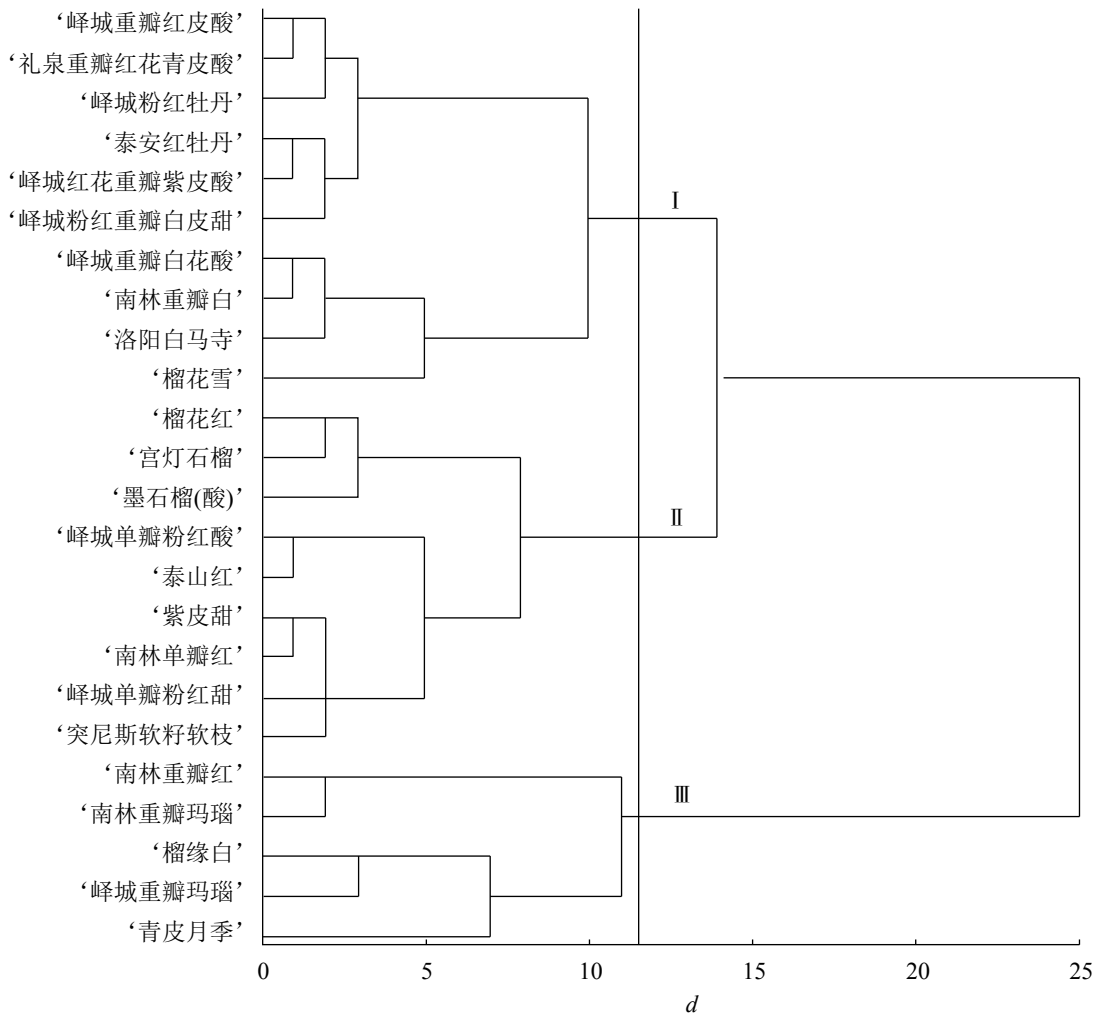


图 1 观赏石榴品种表型性状聚类图

Figure 1 Clustering figure of ornamental pomegranate cultivars based on phenotypic characters

对各类组群个体的数量性状取平均值，质量性状计算个数，得到各组群的特征(表 7)。组群 I 的特征为：花长最大、花萼长最大、花萼瓣数最少，绝大多数为乔木型，主要为开张型，重瓣略多于复瓣，1 年生小枝主要为粉红色和浅绿色，花瓣色主要为白色、粉色、橙红，花萼色主要为橙黄、黄色。组群 II 的特征为：花长最小、花宽最小、花萼长最小、花萼宽最小、花瓣数最小、瓣化雄蕊数最小，主要为乔木型，直立型和开张型各占一半，绝大多数为单瓣，1 年生小枝颜色主要为粉红色，花瓣色主要为橙黄和橙红，花萼色主要为橙黄。组群 III 的特征为：花宽最大、花萼宽最大、花萼瓣数最大、花瓣数最大、瓣化雄蕊数最大，主要为乔木型、开张型、重瓣，1 年生小枝颜色主要为粉红色，花瓣色主要为复色，花萼色主要为橙黄和红色。

表 7 观赏石榴各组群形态特征

Table 7 Morphological characteristics of different ornamental pomegranate cultivars groups after cluster

性状	花长/cm	花宽/cm	花萼长/cm	花萼宽/cm	花萼瓣数/片	花瓣数/片	瓣化雄蕊数/片
组群 I	4.56	5.15	3.21	4.00	6.04	53.62	63.66
组群 II	4.29	3.50	2.97	2.64	6.26	9.70	3.15
组群 III	4.41	5.95	3.06	4.53	7.73	76.60	141.13

性状	株型	枝型	花型	1年生小枝颜色	花瓣色	花萼色
组群 I	1(9), 2(1)	1(4), 2(6)	2(4), 3(6)	1(5), 4(1), 5(4)	1(4), 2(1), 3(3), 5(2)	1(2), 2(4), 4(4)
组群 II	1(6), 2(3)	1(4), 2(4), 3(1)	1(8), 3(1)	1(6), 3(2), 4(1)	2(4), 3(3), 5(2)	3(2), 4(4), 5(1), 6(2)
组群 III	1(4), 2(1)	1(1), 2(4)	3(4), 4(1)	1(4), 2(1)	2(1), 3(1), 6(3)	4(2), 5(1), 6(2)

说明：括号中数值表示品种数，括号外数值表示类型

2.6 观赏石榴基因组 C 值及倍性分析

流式细胞仪测定结果表明(表 8)：24 个观赏石榴品种均为二倍体，C 值范围为 0.28~0.39 pg，品种间 C 值差异较大。其中，单瓣品种群、复瓣品种群、重瓣品种群及台阁品种群的平均 C 值分别为 0.34、0.32、0.34 和 0.33 pg，可见由花型划分的各品种群之间 C 值相差不大。白花品种群、粉花品种群、红花品种群及复色花品种群的平均 C 值分别为 0.34、0.32、0.34 和 0.32 pg，可见由花色划分的各品种群之间 C 值相差不大。中国品种、美国品种、突尼斯品种的平均 C 值分别为 0.33、0.35 和 0.34 pg，各地品种 C 值相差不大。

表 8 观赏石榴倍性及 C 值

Table 8 Ploidy level and C-value of 24 ornamental pomegranate cultivars

序号	品种名	荧光强度	变异系数/%	C值/pg	倍性	序号	品种名	荧光强度	变异系数/%	C值/pg	倍性
1	‘泰安红牡丹’	9 560	6.66	0.32	二倍体	13	‘峰城单瓣粉红酸’	9 645	4.54	0.32	二倍体
2	‘榴缘白’	9 951	4.61	0.33	二倍体	14	‘榴花红’	11 142	6.66	0.37	二倍体
3	‘青皮月季’	11 614	6.84	0.39	二倍体	15	‘紫皮甜’	10 368	6.47	0.34	二倍体
4	‘峰城重瓣红皮酸’	8 435	5.04	0.28	二倍体	16	‘峰城单瓣粉红甜’	9 370	7.42	0.31	二倍体
5	‘峰城粉红牡丹’	10 024	6.17	0.33	二倍体	17	‘突尼斯软籽软枝’	10 151	5.82	0.34	二倍体
6	‘峰城红花重瓣紫皮酸’	9 437	4.58	0.31	二倍体	18	‘墨石榴’	9 257	7.10	0.31	二倍体
7	‘榴花雪’	10 622	5.67	0.35	二倍体	19	‘宫灯石榴’	11 138	5.51	0.37	二倍体
8	‘峰城粉红重瓣白皮甜’	9 801	6.56	0.33	二倍体	20	‘泰山红’	10 331	7.28	0.34	二倍体
9	‘峰城重瓣玛瑙’	9 967	5.99	0.33	二倍体	21	‘南林重瓣红’	9 511	6.57	0.32	二倍体
10	‘洛阳白马寺’	11 078	5.94	0.37	二倍体	22	‘南林单瓣红’	10 580	7.34	0.35	二倍体
11	‘礼泉重瓣红花青皮酸’	10 168	5.71	0.34	二倍体	23	‘南林重瓣白’	10 329	4.26	0.34	二倍体
12	‘峰城重瓣白花酸’	9 160	4.88	0.30	二倍体	24	‘南林重瓣玛瑙’	9 100	6.80	0.30	二倍体

3 讨论

种质资源的调查和评价是研究品种起源、演化、驯化的基础，对优异资源筛选、品种选育具有重要

意义^[32]。利用表型性状分析种质资源的遗传多样性直观易行,能快速了解植物的遗传变异水平^[33]。本研究发现:24个观赏石榴品种具有丰富的表型多样性,平均形态多样性指数为1.453,数量性状多样性指数(1.715)大于质量性状(1.148),与前人对紫薇 *Lagerstroemia indica*^[28]、香瓜 *Cucumis melo*^[34-35] 等的表型多样性研究观点基本相符。其中,花瓣色、花萼色2个质量性状和花长、花宽、花萼长、花萼宽、花萼瓣数、花瓣色、瓣化雄蕊数7个数量性状变异明显,多样性指数高于1.400。

值得注意的是,各数量性状的多样性指数与变异系数变化趋势不一致。与其他数量性状相比,瓣化雄蕊数和花瓣数的多样性指数较小,分别为1.456和1.630,小于平均值(1.715);但两者的变异系数最大,分别为117.59%和78.86%,大于平均值41.82%。多样性指数代表变异分布的均匀度,变异系数代表变异的离散程度。不一致的变化趋势说明变异的范围很大,且变异的分布不均匀,与张海平等^[36]对睡莲 *Nymphaea tetragona* 的表型研究类似,同时符合 TILMAN^[37]关于多样性指数和变异系数之间关系的观点。另外,变异系数在一定程度上反映了进化的快慢,瓣化雄蕊数和花瓣数的变异系数大说明重瓣和雄蕊瓣化程度高的品种,自然品种形成较晚;人工育种加速了雄蕊瓣化和花瓣数量的增多,这与杜鹃花 *Rhododendron simsii*^[38]、矮牵牛 *Petunia hybrid* 等^[39]、日本龙胆花 *Gentiana scabra* 等^[40]等观赏植物品种选育方向一致,说明观赏石榴的选育也是朝着花瓣数增多、雄蕊瓣化的方向进行。

胡标林等^[41]认为:利用株高、芒等表型性状能够明确水稻 *Oryza sativa* 核心种质的亲缘关系。本研究聚类结果表明:24个观赏石榴品种可划分为3个组群,其遗传聚类与花型、颜色、株型关系密切。其中,单瓣品种与复瓣品种、部分重瓣品种的亲缘关系较近,另一部分重瓣品种与台阁品种的亲缘关系较近,这与陈俊愉^[42]的花卉品种分类体系提出的花型演化观点相同。而依据花瓣色划分,橙色花品种与粉色花品种、白色花品种的亲缘关系较近,与复色花品种的亲缘关系较远,与张启翔^[43]对紫薇品种群的划分方法相同。

MOSLEMI 等^[44]、JBIR 等^[45]在对突尼斯和伊朗石榴的研究中认为:石榴品种间亲缘关系与地理环境的相关性不强。本研究聚类结果表明:来源南京的品种并没有聚在一起,分散在3个组群中,该结果同样支持上述观点。王庆军等^[21]通过内部简单序列重复 (ISSR) 将峯城35个观赏石榴分为6个组群,发现依据分子标记划分的大类中有不同的花色和花型,认为基于分子性状的亲缘关系与基于花色、花型等表型性状的亲缘关系不一致。本研究中,基于多个表型性状的聚类结果只有小部分与王庆军等^[21]的分子标记划分结果一致;赵丽华等^[46]在利用 ISSR 对47个石榴栽培品种的聚类研究中也发现了同样的矛盾。观赏石榴品种在繁殖栽培过程中大量的地区间引种交流以及长期的自然选择和人工选择下积累了丰富的遗传变异,使得某些品种在遗传信息上可聚为一类,但形态特征和地理来源却有较大差异,因此,对观赏石榴品种的遗传关系的研究时,需进一步选择合适的分子标记开展分子水平的亲缘关系分析,结合本研究的形态聚类结果共同评判与讨论。

千屈菜科倍性复杂,大多为多倍体物种^[47]。该科的紫薇属 *Lagerstroemia* 中,桂林紫薇 *L. guilinensis* 是四倍体,云南紫薇 *L. intermedia*、大花紫薇 *L. speciosa* 和西双紫薇 *L. venusta* 是六倍体,毛萼紫薇 *L. balansae* 为非整倍体^[48]。本研究发现:引种自各地的24个观赏石榴品种均为二倍体,说明从倍性来看,石榴属品种遗传相对稳定,可进一步探究石榴多倍体育种的可能性,比较二倍体石榴与多倍体石榴的表型差异与遗传差异。

本研究中观赏石榴品种主要是单瓣类、复瓣类、重瓣类,而台阁类品种的数量较少。故还需广泛收集不同类别的品种资源,并结合分子生物学证据,开展更为广泛的观赏石榴遗传多样性、品种分类研究。

4 结论

观赏石榴种质资源具有丰富的表型遗传多样性,以花的数量性状最为突出,其中瓣化雄蕊数和花瓣数的变异系数分别为117.59%和78.86%。聚类分析可分为3大组群,组群I和组群II聚在一起,两者与组群III的亲缘关系均较远,其遗传聚类与花型、颜色、株型关系密切,暗示着花色、花型在栽培观赏石榴的驯化育种过程中的重要指示性作用。24个观赏石榴品种均为二倍体,显示出石榴观赏品种较强的遗传稳定性。

5 参考文献

- [1] 苑兆和. 中国果树科学与实践: 石榴[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2015: 81.
- [2] YUAN Zhaohe, FANG Yanming, ZHANG Taikui, *et al.* The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, **16**(7): 1363 – 1374.
- [3] 祝遵凌. 园林树木栽培学[M]. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 2015: 261.
- [4] 苑兆和, 吕菲菲. 石榴文化艺术与功能利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 13.
- [5] JEONG H J, PARK M Y, KIM S. Identification of chromosomal translocation causing inactivation of the gene encoding anthocyanidin synthase in white pomegranate (*Punica granatum* L.) and development of a molecular marker for genotypic selection of fruit colors [J]. *Hortic Environ Biotechnol*, 2018, **59**: 857 – 864.
- [6] NAFEES M, JASKANI M J, AHMED S, *et al.* Morpho-molecular characterization and phylogenetic relationship in pomegranate germplasm of Pakistan [J]. *Pak J Agric Sci*, 2015, **52**(1): 97 – 106.
- [7] SARKHOSH A, ZAMANI Z, FATAHI R, *et al.* Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2011, **17**(3): 305 – 311.
- [8] ATTANAYAKE S R M R, KUMARI S A S M, WEERAKKODY W A P, *et al.* Molecular diversity and genetic relationships of Sri Lankan pomegranate *Punica granatum* landraces assessed with inter simple sequence repeat (ISSR) regions [J]. *Nordic J Bot*, 2017, **35**(4): 385 – 394.
- [9] SHINDE A S, MAHAJAN S R, KAKDE S H. RAPD based molecular diversity analysis of different varieties of pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. *Int J Agric Sci*, 2015, **11**(1): 141 – 145.
- [10] 陈芸, 王继莲, 丁晓丽, 等. 新疆石榴种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. *西北植物学报*, 2016, **36**(5): 916 – 922.
CHEN Yun, WANG Jilian, DING Xiaoli, *et al.* Genetic diversity of germplasm collection of pomegranate in Xinjiang using SRAP markers [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2016, **36**(5): 916 – 922.
- [11] 马丽, 侯乐峰, 郝兆祥, 等. 82 个石榴品种遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *果树学报*, 2015, **32**(5): 741 – 750.
MA Li, HOU Lefeng, HAO Zhaoxiang, *et al.* Genetic diversity analysis of 82 pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars by ISSR markers [J]. *J Fruit Sci*, 2015, **32**(5): 741 – 750.
- [12] 韩玲玲, 苑兆和, 冯立娟, 等. 不同石榴品种果实成熟期酚类物质组分与含量分析[J]. *果树学报*, 2013, **30**(1): 99 – 104.
HAN Lingling, YUAN Zhaohe, FENG Lijuan, *et al.* Analyses on polyphenol composition and contents of different pomegranate cultivars at fruit maturation stage [J]. *J Fruit Sci*, 2013, **30**(1): 99 – 104.
- [13] FERRARA G, CAVOSKI I, PACIFICO A, *et al.* Morpho-pomological and chemical characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes in Apulia region, Southeastern Italy [J]. *Sci Hortic*, 2011, **130**(3): 599 – 606.
- [14] TEH H E, YOKOYAMA W H, GERMAN J B, *et al.* Hypocholesterolemic effects of expeller-pressed and solvent-extracted fruit seed oils and defatted pomegranate seed meals [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, **67**(22): 6150 – 6159.
- [15] ELFALLEH W, HANNACHI H, GUETAT A, *et al.* Storage protein and amino acid contents of Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars [J]. *Genet Resour Crop Evolut*, 2012, **59**(6): 999 – 1014.
- [16] HASNAOUI N, JBIR R, MARS M, *et al.* Organic acids, sugars and anthocyanins contents in juices of Tunisian pomegranate fruits [J]. *Int J Food Prop*, 2011, **14**(4): 741 – 757.
- [17] ELFALLEH W, YING M, NASRI N, *et al.* Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2011, **62**(3): 200 – 206.
- [18] MARTINEZ-NICOLAS J J, MELGAREJO P, LEGUA P, *et al.* Genetic diversity of pomegranate germplasm collection from Spain determined by fruit, seed, leaf and flower characteristics [J]. *Peer J*, 2016, **4**: e2214.
- [19] 陈俊愉, 程绪珂. 中国花经[M]. 上海: 上海文化出版社, 1994: 200 – 204.
- [20] 汪小飞. 石榴品种分类研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
WANG Xiaofei. *Studies on the Cultivar Classification of Punica granatum L.* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2007.
- [21] 王庆军, 马丽, 郝兆祥, 等. 观赏石榴种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *浙江农业学报*, 2018, **30**(2): 236 – 241.
WANG Qingjun, MA Li, HAO Zhaoxiang, *et al.* Analysis on germplasm genetic diversity of ornamental pomegranate (*Punica granatum* L.) by ISSR markers [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 2018, **30**(2): 236 – 241.

- [22] HUANG Hui, TONG Yan, ZHANG Qunjie, *et al.* Genome size variation among and within *Camellia* species by using flow cytometric analysis [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(5): e64981.
- [23] QIN Gaihua, XU Chunyan, MING R, *et al.* The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome and the genomics of punicalagin biosynthesis [J]. *Plant J*, 2017, **91**: 1108 – 1128.
- [24] 刘丽, 陈延惠, 曹尚银, 等. 大籽石榴倍性育种研究初探[C]. 中国园艺学会石榴分会. 中国石榴研究进展(一). 北京: 中国农业出版社, 2010: 106 – 110.
- [25] SHAO Jianzhu, CHEN Chunli, DENG Xiuxin. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*) [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2003, **75**(3): 241 – 246.
- [26] 国家林业局. 植物新品种特异性、一致性、稳定性测试指南: 石榴属 GB/T 35566–2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [27] 林峰, 肖月娥, 周翔宇, 等. 25份鸢尾属植物基因组 DNA C值的流式测定[J]. *草地学报*, 2018, **26**(4): 985 – 990.
LIN Feng, XIAO Yue'e, ZHOU Xiangyu, *et al.* Estimation of genomic C value of 25 samples of Iris plants by flow cytometry [J]. *Acta Agrestia Sin*, 2018, **26**(4): 985 – 990.
- [28] 王业社, 侯伯鑫, 索志立. 紫薇品种表型多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2015, **16**(1): 71 – 79.
WANG Yeshe, HOU Boxin, SUO Zhili. Phenotypic diversity of *Lagerstroemia indica* cultivars [J]. *J Plant Genet Resour*, 2015, **16**(1): 71 – 79.
- [29] 蔡翠萍, 汪书丽, 权红, 等. 藏药材喜马拉雅紫茉莉种质资源的形态多样性[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2013, **38**(12): 61 – 66.
CAI Cuiping, WANG Shuli, QUAN Hong, *et al.* On morphological diversity in germplasm resources of Tibetan herbal medicine *Mirabilis himalaica* [J]. *J Southwst China Norm Univ Nat Sci Ed*, 2013, **38**(12): 61 – 66.
- [30] 马育华. 田间实验和统计方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.
- [31] YAN Jiajun, ZHANG Jianbo, SUN Kaiyan, *et al.* Ploidy level and DNA content of *Erianthus arundinaceus* as determined by flow cytometry and the association with biological characteristics[J]. *PLoS One*, 2016, **11**(3): e0151948. doi: 10.1371/journal.pone.0151948.
- [32] DENWAR N N, AWUKU F J, DIERS B, *et al.* Genetic diversity, population structure and key phenotypic traits driving variation within soyabean (*Glycine max*) collection in Ghana [J]. *Plant Breeding*, 2019, **138**(5): 577 – 587.
- [33] 颜刚刚, 欧阳丽婷, 谢军, 等. 新疆地区欧洲李叶片表型性状多样性及亲缘关系分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2018, **27**(3): 72 – 78.
XIE Ganggang, OUYANG Liting, XIE Jun, *et al.* Analyses on diversity of leaf phenotypic traits and genetic relationships of *Prunus domestica* in Xinjiang region [J]. *J Plant Resour Environ*, 2018, **27**(3): 72 – 78.
- [34] LIU Li, KAKIHARA F, KATO M. Characterization of six varieties of *Cucumis melo* L. based on morphological and physiological characters, including shelf-life of fruit [J]. *Euphytica*, 2004, **135**: 305 – 313.
- [35] SZAMOSI C, SOLMAZ I, SARI N, *et al.* Morphological evaluation and comparison of Hungarian and Turkish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm [J]. *Sci Hortic*, 2010, **124**(2): 170 – 182.
- [36] 张海平, 房伟民, 陈发棣, 等. 部分睡莲属植物形态性状的多样性分析[J]. *南京农业大学学报*, 2009, **32**(4): 47 – 52.
ZHANG Haiping, FANG Weimin, CHEN Fadi, *et al.* Investigation on the morphological diversity of taxa in genus *Nymphaea* [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2009, **32**(4): 47 – 52.
- [37] TILMAN D. The ecological consequences of changes in biodiversity: a search for general principles [J]. *Ecology*, 1999, **80**(5): 1455 – 1474.
- [38] 程淑媛. 中国杜鹃花栽培品种资源与分类研究[D]. 赣州: 赣南师范大学, 2017: 71 – 72.
CHENG Shuyuan. *Study on Resources and Classification of Azalea Cultivars in China*[D]. Ganzhou: Gannan Normal University, 2017: 71 – 72.
- [39] LIU Caixian, HE Yehong, GOU Tianyun, *et al.* Identification of molecular markers associated with the double flower trait in *Petunia hybrida* [J]. *Sci Hortic*, 2016, **206**: 43 – 50.
- [40] NAKATSUKA T, SAITO M, YAMADA E, *et al.* Isolation and characterization of the C-class *MADS-box* gene involved in the formation of double flowers in Japanese gentian [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, **15**(1): 182.
- [41] 胡标林, 万勇, 李霞, 等. 水稻核心种质表型性状遗传多样性分析及综合评价[J]. *作物学报*, 2012, **38**(5): 829 – 839.

- HU Bialin, WAN Yong, LI Xia, *et al.* Analysis on genetic diversity of phenotypic traits in rice (*Oryza sativa*) core collection and its comprehensive assessment [J]. *Acta Agron Sin*, 2012, **38**(5): 829 – 839.
- [42] 陈俊瑜. “二元分类”: 中国花卉品种分类新体系 [J]. *北京林业大学学报*, 1998, **20**(2): 1 – 5.
CHEN Junyu. “Dual classification”: a new classification system for Chinese flower cultivars [J]. *J Beijing For Univ*, 1998, **20**(2): 1 – 5.
- [43] 张启翔. 紫薇品种分类及其在园林中的应用 [J]. *北京林业大学学报*, 1991, **13**(4): 57 – 66.
ZHANG Qixiang. Studies on cultivars of crape-myrtle (*Lagerstroemia indica*) and their uses in urban greening [J]. *J Beijing For Univ*, 1991, **13**(4): 57 – 66.
- [44] MOSLEMI M, ZAHRAVI M, KHANIKI G B. Genetic diversity and population genetic structure of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Iran using AFLP markers [J]. *Sci Hort*, 2010, **126**(4): 441 – 447.
- [45] JBIR R, HASNAOUI N J, MARS M, *et al.* Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis [J]. *Sci Hort*, 2008, **115**(3): 231 – 237.
- [46] 赵丽华, 李名扬, 王先磊, 等. 石榴种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. *果树学报*, 2011, **28**(1): 66 – 71.
ZHAO Lihua, LI Mingyang, WANG Xianlei, *et al.* Genetic diversity and genetic relationship of pomegranate (*Prunica granatum*) germplasm evaluated by ISSR markers [J]. *J Fruit Sci*, 2011, **28**(1): 66 – 71.
- [47] GRAHAM S A, CAVALCANTI G T B. New chromosome counts in the Lythraceae and a review of chromosome numbers in the family [J]. *Syst Bot*, 2001, **26**(3): 445 – 458.
- [48] 刘亚琼. 中国紫薇属植物倍性研究及其 cpDNA 多样性分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
LIU Yaqiong. *Ploidy Determination in Lagerstroemia L. Using Flow Cytometry and Its Polymorphism of cpDNA* [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010.