

# 不同化学型樟树的 RAPD 分析

张国防, 陈存及

(福建农林大学林学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 用 RAPD 标记技术分析了 30 个不同化学型樟树 [*Cinnamomum camphora* (L.) Presl] 样本的遗传关系。14 个引物共扩增出 170 个位点, 其中多态位点 161 个, 多态性位点百分率达 94.71%, 特异位点有 15 个。聚类结果显示, 当  $\lambda = 13$  时, 30 个樟树样本被分为 4 类, 即芳樟型(主成分为芳樟醇)、脑樟型(主成分为樟脑)、桉樟型(主成分为 1,8-桉叶油素)和黄樟型(主成分为黄樟醇), 表明不同化学型樟树样本间的遗传关系与其叶精油的主成分有一定的相关性。

**关键词:** 樟树; 化学型; 分类; RAPD

**中图分类号:** Q813.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)02-0017-05

**RAPD analysis of different chemotypes of *Cinnamomum camphora*** ZHANG Guo-fang, CHEN Cun-ji (Forestry College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(2): 17-21

**Abstract:** Genetic relationships among thirty samples of different chemotypes of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl were studied by RAPD technique. 170 loci were amplified by fourteen primers, among which 161 loci were polymorphic loci. The polymorphic loci percentage was 94.71%, fifteen specific RAPD markers were detected among these loci. The results of cluster analysis showed that when  $\lambda = 13$ , thirty samples were divided into four groups: linalool-type, camphor-type, cineol-type and safrole-type, their main component was linalool, camphor, 1,8-cineole and safrole respectively. It is indicated that the genetic relationships among different chemotypes of *C. camphora* relate to the main components of essential oil in leaf.

**Key words:** *Cinnamomum camphora* (L.) Presl; chemotype; classification; RAPD

樟树 [*Cinnamomum camphora* (L.) Presl] 是中国珍贵的香料树种之一, 其精油的开发利用历史悠久, 但产业化开发较困难, 根本原因是樟树群体和个体之间的精油含量和化学成分差异较大, 良种选育基础薄弱, 单位精油产量低, 精油成分复杂且经济效益不高<sup>[1]</sup>。樟树叶精油主要成分包括芳樟醇、樟脑、1,8-桉叶油素、龙脑、异橙花叔醇和黄樟油素等, 为便于开发利用, 许多学者根据叶精油主成分的不同将樟树划分为不同的化学型, 即芳樟、脑樟、桉樟、龙脑樟、异樟和黄樟等<sup>[2]</sup>。由于根据外部形态特征很难区别不同化学型的樟树, 且其精油的合成、转化和积累受遗传和环境的双重影响, 因此, 化学分类只能作为重要的辅助分类手段之一, 并不能替代传统的植物分类方法<sup>[3]</sup>。分子标记技术是林木分类和亲缘关系研究的理想手段<sup>[4]</sup>, 宋爱云等利用 RAPD 分子标记技术分析了香樟优选株(高含芳樟醇)和普通株(低含芳樟醇)间的遗传差异及遗传相

似性<sup>[5]</sup>, 为“樟树叶精油主成分含量主要受遗传控制”的观点提供了有力证据。据此, 作者利用 RAPD 技术, 对不同化学型樟树的基因组 DNA 进行了分析, 以揭示不同化学型樟树在分子遗传学上的差异, 为樟树良种的定向选育和开发、遗传改良及种质资源保护提供重要的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试样品取自福建农林大学南平校区的 1~48 年生樟树, 采用闻叶选择法预选一批不同化学类型的樟树单株, 采集预选单株叶片提取精油, 并对所得

收稿日期: 2006-09-04

基金资助: 福建省林业厅重大种苗攻关项目资助(200306)

作者简介: 张国防(1966-), 男, 福建莆田人, 博士, 副教授, 主要从事森林培育、经济林栽培及森林防火研究。

叶精油进行色谱分析<sup>[6]</sup>,按其化学主成分确定类型(见表1)。每个类型选择6~8个单株,共30个样本。取春梢刚萌动的长约1~3 cm的嫩叶,装入保鲜袋,立即放入装有冰块的保温箱中,运回实验室,置于-20℃冰箱中保存,备用。

表1 30份樟树样本的化学型  
Table 1 Chemotypes of thirty samples of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl

类型 Type	样号 No. of sample	主要成分 Main component	含量/% Content	
樟脑型 Camphor-type	1	樟脑	61.29	
	2	camphor	88.67	
	10		92.27	
	14		76.13	
	15		83.67	
	16		80.78	
桉樟型 Cineole-type	4	1,8-桉叶油素	62.58	
	5	1,8-cineole	57.36	
	6		43.95	
	11		45.87	
	12		60.87	
	13		49.57	
	芳樟型 Linalool-type	3	芳樟醇	59.22
7		linalool	88.45	
8			90.45	
9			91.24	
17			93.56	
18			94.78	
19			95.54	
20			88.51	
21			70.65	
22			79.81	
23			75.42	
黄樟型 Safrole-type		24	黄樟醇	43.86
		25	safrole	41.35
	26		54.05	
	27		60.06	
	28		52.32	
	29		65.84	
	30		60.05	

所用PCR仪为德国Eppendorf公司生产的Mastercycler personal 5333型PCR扩增仪;所用试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 樟树基因组DNA的提取采用CTAB法<sup>[7]</sup>,并略加改进。

1.2.2 RAPD扩增条件及程序 从120条引物中筛选出14条条带清晰且重复性高的引物(见表2)

进行扩增反应。经优化的反应体系总体积20 μL,其中包括2.0 μL 10 × PCR Buffer、1.6 μL 25 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、1.6 μL 2.5 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs、0.4 μL 10 μmol · L<sup>-1</sup>引物、2.0 μL 8 ng · μL<sup>-1</sup>模板及0.2 μL 5 U · μL<sup>-1</sup> Taq DNA聚合酶。

扩增程序为:94℃预变性7 min;然后进行38个循环反应,反应条件为94℃变性90 s,37℃退火30 s,72℃延伸90 s;最后于72℃延伸10 min。

扩增产物在1.4%琼脂糖凝胶上电泳后,染色并拍照记录。

表2 用于樟树RAPD分析的随机引物  
Table 2 The arbitrary primers used for RAPD analysis of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	引物 Primer	序列(5'→3') Sequence
S43	GTCGCCGTCA	S130	GGAAGCTTGG
S45	TGAGCGGACA	S146	AAGACCCCTC
S60	ACCCGGTCAC	S380	GTGTCGGGAG
S65	GATGACCGCC	S397	AGCCTGAGCC
S93	CTCTCCGCCA	S1471	AAGACCGGGA
S97	ACGACCGACA	S86	GTGCCTAACC
S129	CCAAGCTTCC	S133	GGCTGCAGAA

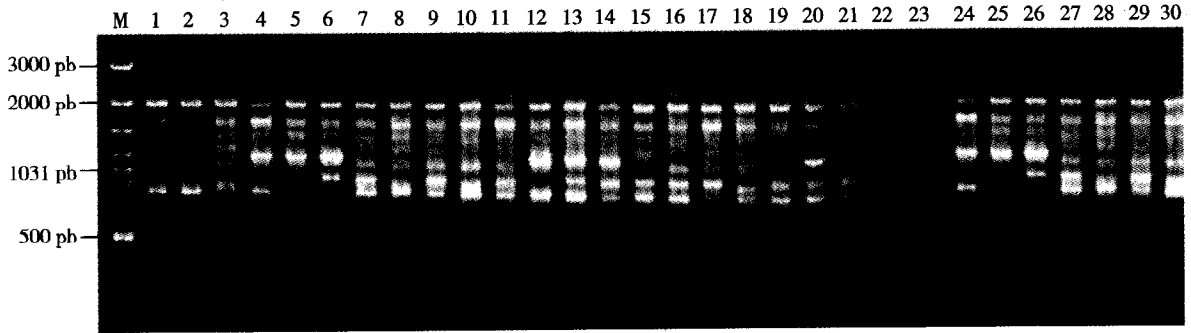
## 1.3 数据处理

根据RAPD扩增产物的电泳结果记录清晰可重复的RAPD条带,对于同一引物的扩增产物,迁移率相同的条带记为1个位点。将电泳图谱中扩增阳性(有条带出现)赋值为“1”,扩增阴性(无条带出现)赋值为“0”,从而获得RAPD表型数据矩阵,相同引物扩增出的同一长度(同一电泳迁移率)的条带视为同一位点。利用SPSS 10.07统计软件对RAPD表型数据矩阵进行分析,计算各样品间的欧氏距离及其相似系数,并利用离差平方和法(Ward's method)对数据进行聚类分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同化学型樟树的RAPD分析结果

利用14条条带清晰且重复性高的引物对30个樟树样本的基因组DNA进行扩增,共扩增出170个位点,其中多态性位点161个,多态性位点百分率达94.71%;不同引物对30份样本的扩增条带数为7(S93)~18(S146)条,平均每条引物扩增出12.14个位点。引物S65的扩增结果见图1。



M: Marker; 1, 2, 10, 14, 15, 16: 脑樟型 Camphor-type; 4, 5, 6, 11, 12, 13: 桉樟型 Cineole-type; 3, 7, 8, 9, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23: 芳樟型 Linalool-type; 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30: 黄樟型 Safrole-type.

图 1 引物 S65 对 30 个樟树样本的 RAPD 扩增图谱  
Fig. 1 The RAPD pattern of thirty samples of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl amplified by primer S65

在扩增出的 170 个位点中有 15 个特异位点及 16 个 2 个单株共享的特异位点(表 3), 这些特异位点为鉴别不同类型樟树及其优良单株提供了依据。

### 2.2 不同化学型樟树的遗传关系分析

利用 SPSS 软件计算出的 30 个樟树样本间的欧氏距离及其相似系数显示, 30 个樟树样本间的相似系数为 0.000 ~ 1.000, 差异很大。18 号和 19 号样本间的相似系数最大, 达 1.000, 二者均为芳樟型, 实际测得二者的芳樟含量分别为 94.78% 和 95.54%; 样本 5(桉叶油素含量为 57.36%) 和样本

29(黄樟油素含量为 65.84%) 之间的相似性最小, 相似系数为 0.000。研究发现, 脑樟型内各样本间的相似系数为 0.550 ~ 0.886, 脑樟型与芳樟型样本间的相似系数为 0.406 ~ 0.707, 与桉樟型样本间的相似系数为 0.340 ~ 0.632, 与黄樟型样本间的相似系数为 0.049 ~ 0.239; 桉樟型内各样本间的相似系数为 0.564 ~ 0.846, 桉樟型与芳樟型样本间的相似系数为 0.309 ~ 0.618, 与黄樟型样本间的相似系数为 0.000 ~ 0.182; 芳樟型内各样本间的相似系数为 0.525 ~ 1.000, 芳樟型与黄樟型样本间的相似系数

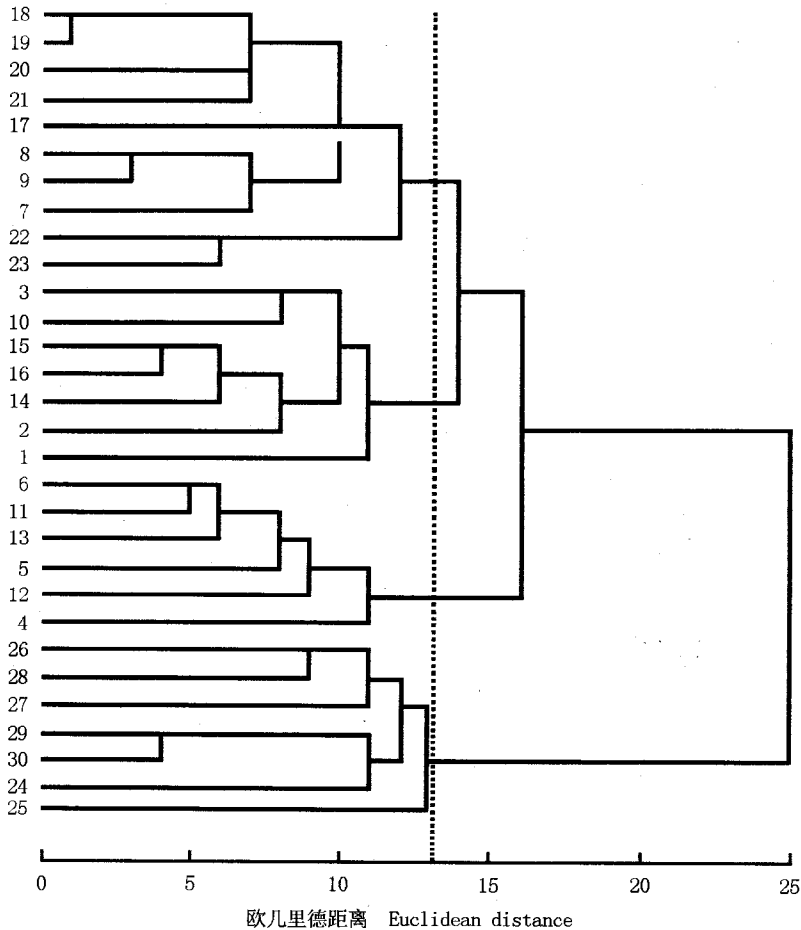
表 3 30 个樟树样本 RAPD 分析中的特异位点  
Table 3 Specific loci in RAPD analysis of thirty samples of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl

引物 Primer	特异位点 Specific locus		样本号 No. of sample	共享引物 Share primer	共享特异位点 Share specific locus		样本号 No. of sample
	位点 Locus	长度/bp Length			位点 Locus	长度/bp Length	
S43	7	430	16	S43	1	170	27, 29
	8	500	20		S60	4	280
S65	11	500	27	S65	3	120	24, 26
	12	520	25		14	580	10, 27
	15	600	3		S97	4	360
S397	6	360	24	S397	6	420	17, 18
	12	650	24		S133	11	1 100
S129	6	330	25	S129	11	560	5, 11
S130	6	500	24	S129	1	280	11, 13
	9	800	26		1	100	4, 5
	11	1 031	26		3	190	25, 26
S146	9	520	25	S146	9	450	9, 10
	11	600	27		10	610	25, 26
S380	4	500	26	S146	7	450	4, 5
	9	1 100	25		10	550	3, 5
					15	900	4, 11

为 0.058 ~ 0.309; 黄樟型内各样本间的相似系数为 0.475 ~ 0.886。不同化学型樟树样本间的平均相似系数小于各化学型内的平均相似系数, 且其相似系数大小与叶精油的主要化学成分有关。

根据欧氏距离, 利用离差平方和法 (Ward's method) 进行聚类分析, 结果见图 2。由图 2 可见, 截取  $\lambda = 13$ , 可将 30 个样本分为 4 类, 即脑樟型、桉樟型、芳樟型和黄樟型。24、25、26、27、28、29 和 30 号样本聚为一类, 其叶精油的主要成分均为黄樟油素; 4、5、6、11、12 和 13 号样本聚为一类, 其叶精油的主

要成分均为 1,8-桉叶油素; 7、8、9、17、18、19、20、21、22 和 23 号样本聚为一类, 其叶精油的主要成分均为芳樟醇; 1、2、3、10、14、15 和 16 号样本聚为一类, 除 3 号样本外, 其叶精油的主要成分均为樟脑。除 3 号样本的化学型属于芳樟型, 但却与脑樟型聚为一类外, 其他样本的 RAPD 聚类结果均与化学分类结果一致, 说明同一化学型樟树的遗传关系较近, 具有一定的遗传相似性, 而不同化学型樟树间的遗传关系却较远。



1, 2, 10, 14, 15, 16: 脑樟型 Camphor-type; 4, 5, 6, 11, 12, 13: 桉樟型 Cineole-type; 3, 7, 8, 9, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23: 芳樟型 Linalool-type; 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30: 黄樟型 Safrole-type.

图 2 基于 RAPD 分析的 30 个樟树样本聚类分析的树状图  
Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis based on RAPD analysis of thirty samples of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl

根据聚类分析结果, 结合不同样本主要化学成分的含量(表 1) 进行比较分析, 可以看出, 同一化学型内不同单株叶精油主要成分的含量也存在遗传差异, 主成分含量相近则遗传关系也较近。在聚为一

大类的桉樟型的 6 个样本中, 4 号样本单独聚为一组, 其桉叶油素含量最高, 达 62.58%; 另外 5 个聚为一组, 其桉叶油素的含量为 60.87%; 样本 5、6、11 和 13 聚为一组, 这

些样本的桉叶油素含量均在 60% 以下,其中样本 6、11 和 13 被聚为一小组,它们的桉叶油素含量分别为 43.95%、45.87% 和 49.57%,而样本 5 单独成为一小组,其桉叶油素含量为 57.36%,总体上呈现出桉叶油素含量相近,遗传关系也较近的趋势。同样,在其他化学型内也表现出相似的趋势。

样本 3 的芳樟醇含量为 59.22%,远低于其他芳樟型样本,从主要化学成分上看仍属于芳樟型,但根据 RAPD 数据进行的聚类分析却将其归入脑樟型中,这可能与樟脑含量达 31.56% 有关。由于樟树为异株授粉,孤立或散生的樟树自然结果率极低,甚至只开花不结实,而在居群中樟树结果率却较高,必然造成不同化学型樟树基因间的交流,形成复杂的遗传关系,使有性繁殖子代出现分离现象,后代叶精油的主要化学成分发生改变,出现不同化学型的樟树<sup>[8]</sup>。样本 3 的母本极有可能是脑樟型,所以其遗传关系更接近脑樟。

### 3 讨 论

1) 樟树具有丰富的遗传多样性,育种潜力巨大。供试的 30 个叶精油主成分及含量不同的樟树单株的 DNA 多态性位点百分率高达 94.71%,可能与樟树主要以异株授粉繁殖后代密切相关。丰富的遗传变异也为樟树的育种提供了极其丰富的材料。

2) 由于樟树叶精油主要化学成分的差异主要受遗传控制,因此,可用 RAPD 分子标记技术鉴别不同化学型的樟树。尽管不同化学型樟树在形态上极其相似,但由于长期的生殖隔离、环境差异和个体进化等原因,导致其体内精油含量及化学成分差异很大<sup>[9]</sup>。

精油的合成、转化和积累受遗传和环境的双重制约,加之不同个体和生态条件的差异,致使樟树体内参与精油合成及代谢的酶浓度、种类及活化程度有所差异,最终导致其代谢途径及强化程度不同。如果樟树的代谢能力比较强,萜类化合物在输送过程中则发生氧化还原、环化、异构化及芳化等反应,从而产生一系列代谢产物,形成精油中的一系列复杂成分。有些成分在精油中含量很少,可能是代谢过程中的中间产物;有些成分含量较高或在精油中

占主导地位,可能是由于控制该化合物合成的生物酶在体内活性较强,而控制该化合物转化的生物酶在体内活性较弱,因此该化合物能相对稳定地积累在植物组织内,形成精油的 1 个化学类型。基于樟树叶总 DNA 的 RAPD 数据所做的聚类分析结果与樟树叶油主要化学成分的聚类分析结果基本一致,因此,可以认为樟树叶精油的化学型主要受遗传控制,环境因素是次要的。另外,无性繁殖后代能保持母株叶精油的化学类型,为不同化学型樟树的选育及定向开发提供了重要的理论依据。

3) 不同化学型樟树间及相同化学型樟树的个体间在遗传上表现出复杂的相关性,其亲缘关系主要取决于叶精油的主要化学成分类型,但也与主成分的含量相关,表现出含量相近的趋同性,因此,可以用 RAPD 分子标记技术筛选樟树叶精油主成分含量高的优良单株。

4) 个别单株(如 3 号样本)基于 RAPD 数据的聚类结果与根据化学成分所进行的聚类分析结果不一致,除了与樟树异株授粉引起后代分离(叶精油主要化学成分的变化)有关外,还可能与生物酶活性在某种程度上受环境因素的影响有关,详细原因有待进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 张国防,陈存及,邢建宏,等. 工业原料林营建中的若干问题[J]. 林业科技开发, 2004, 18(3): 7-10.
- [2] 程必强,喻学俭,丁靖坤,等. 中国樟属植物资源及其芳香成分[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 1997. 3-6.
- [3] 李飞. 中国樟树精油资源与开发利用[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000. 36-56.
- [4] 甘四明,施季森,白嘉雨,等. 林木分子标记研究进展[J]. 林业科学研究, 1998, 11(4): 428-434.
- [5] 宋爱云,陈辉,董林水. RAPD 分子标记在鉴定香樟优选株和普通株中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(3): 263-265.
- [6] 张国防,陈存及. 福建樟树叶油的化学成分及其含量分析[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(4): 69-70.
- [7] 邹喻萍,葛颂,王晓东. 系统进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 16-17.
- [8] 程必强,喻学俭. 新香料植物细毛樟的研究[J]. 林产化学与工业, 1993, 13(1): 57-63.
- [9] 张国防,陈存及,赵刚. 樟树叶油地理变异的研究[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(1): 22-25.