

International Symposium on Development of Improved Methods to Identify *Shorea* Species Wood and its Origin

September 25--26, 2007

Yayoi Auditorium Ichijo Hall, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Organizer: Forestry and Forest Products Research Institute
Co-Organizers: Anatomy and Quality of Wood working group of
The Japan Wood Research Society
Sponsors: IUFRO Division 5.00 and 5.01.06, IUFRO-J

Chairman : Tomoyuki FUJII
Members: Kiyoshi NAKASHIMA, Hisashi ABE, Atsushi KATO
Yoshihiko TSUMURA, Kazumasa YOSHIDA,
Hiroshi YOSHIMARU, Akira KAGAWA Katsushi KURODA,
Ryo FUNADA, Yukie SAITO, Juniji SUGIYAMA

東南アジア産木材の樹種識別および産地特定技術に関する 国際シンポジウム

平成 19 年 9 月 25 日～26 日
東京大学 弥生講堂・一条ホール

委員長： 藤井智之
委員： 中島 清、安部 久、加藤 厚、津村義彦、吉田和正、吉丸博志
香川 聡、黒田克史、船田 良、斉藤幸恵、杉山淳司

主催： 独立行政法人 森林総合研究所
共催： 日本木材学会 組織と材質研究会
後援： IUFRO 第 5 部会および 5.01.06 分科会, IUFRO-J

はじめに

違法伐採と違法に伐採された木材の市場での流通は、持続可能な森林経営によって生産される正当な木材を圧迫し、生産国及び消費国において様々な問題を引き起こすばかりでなく、地球規模での森林破壊につながるために、世界的に大きな環境問題となっています。平成19年2月に開催された「違法伐採対策推進国際セミナー2007」では、この問題に対する各国の取り組みが紹介されましたが、その中では違法伐採木材の検証システムにまでは議論が及んでいません。この会議では、我が国の「木材表示推進協議会」の取り組みが紹介され、木材・木製品の樹種・産地の表示が違法伐採対策のツールになるとして各国から高く評価されました。しかし、それらの表示の正確性を科学的に証明するための検証方法については、具体的な手法の提案はなく、関係する研究機関が共同で模索する必要があるとされたところです。

本シンポジウムでは、はじめに、東南アジアの主要木材輸出国の研究者から、東南アジアでの森林資源の現状と、東南アジアから木材としての供給の増加が見込まれる樹種、そして木材市場における樹種識別・樹種区分等について講演を受け、意見交換を行います。続いて、樹種識別・産地特定技術の開発に関する研究成果に基づいて、樹種・産地表示を推進するための、効率的な検証手法、情報共有の方法について議論します。本シンポジウムにおける議論を通して、東南アジア産木材の樹種識別・産地特定技術の基盤となる樹種データベースの構築に向けた国際的な共同作業を開始することの重要性を確認できることを期待しています。

平成19年9月14日

委員長

藤井 智之

目 次

第1セッション

東南アジアから日本に輸入されている木材の樹種 安部 久	50
天然林からの生産される木質資源は将来二次林から生産される 一二次林から生産される木材の有用性、利用、樹種識別－ Lim Seng-Choon, Samsudin M & Gan Kee-Seng	52
インドネシアにおける伐採樹種と樹種識別(仮題) Sri Nuguroho Marsoem	58
マレーシアの <i>Neobalanocarpus heimii</i> の個体識別のための DNA フィンガープリントデータベ ース S.L. Lee and L.H. Tnah	59
葉緑体 DNA を用いたインドネシアの <i>Shorea</i> 属の 4 種の地理的起原の同定 Sapto Indrioko	60

第2セッション

研究プロジェクト「南洋材の樹種識別および産地特定の技術開発」の概要 藤井智之	66
心材抽出成分に基づくレッドメランチ類の識別 加藤 厚、菱山正二郎	67
Red meranti 木材の顕微鏡による識別拠点 安部 久、藤井智之	70
樹種識別のための木材からの DNA 抽出および遺伝子検出 吉田和正、香川 聡、西口 満	73
フタバガキ科 <i>Shorea</i> 属の樹種識別のための DNA データベースの構築 津村義彦、角友之、田口由利子、福江陽子、谷尚樹、吉村研介、上谷浩一、原田光、竹 内やよい、Bibian Diway、Reiner Finkeldey、Soon Leong Lee、Norwati Muhammad	81
安定同位体および無機元素分析による東南アジア産材の産地識別の可能性 香川 聡、黒田克史、安部 久、藤井智之、伊藤優子	84
樹種識別・産地特定技術の単板への応用例 藤井智之、安部 久、香川 聡、加藤 厚、吉田和正	90

東南アジアから日本に輸入されている木材の樹種

安部 久

森林総合研究所 木材特性研究領域

e-mail: abeq@affrc.go.jp

緒言

近年、熱帯産材の樹種識別の重要性が高くなっている。その背景には、絶滅危惧種の樹木の盗伐や、違法伐採によって生産される木材が市場に流通している現状がある。また、木材の輸入関税を安くするため、木材製品の樹種を偽って輸入している例も多い。東南アジアから多くの木材を輸入している日本としては、東南アジアの森林資源を有効に活用するためにもどのような樹種の木材が輸入されているかを把握しておく必要がある。日本国内においても業界団体内に木材製品自主表示の動きがあり、製材、集成材、合板などの樹種や原産地を表示し、取引の透明性と消費者への説明責任向上を図ろうとしている。それを検証する上でも、東南アジアから日本に輸入されている木材の樹種を識別することは重要であり、それをもとに国内で流通している木材の樹種を把握する事ができる。1948年以降、日本は東南アジア産の丸太の輸入を開始し、その量は増加してきた。輸入された木材の大半は、合板に国内で加工されてきた。しかし、1998年のインドネシアの丸太輸出禁止措置以降、製品の輸入に切り替わり、現在では、日本が東南アジアから輸入する60%以上の木材は、合板として輸入されている。2002年には、日本が輸入する合板の90%がインドネシアとマレーシアからのものである。

日本に丸太が輸入される際に、各税関において、樹種の識別を含めた丸太の検量が行われ、それを元に、かつては日本に輸入される木材樹種が把握できた。しかし、合板輸入が中心となった今日では、使用されている木材の樹種の識別が困難で、東南アジア地域から輸入される木材の樹種の把握がされてこなかった。

しかし、南洋材の関税率の見直し以降、東南アジアから日本に輸入される合板の税関における申告樹種と原産地国における合板用木材の消費傾向の齟齬が指摘されている。その背景として、合板用木材樹種として最も重要なレッドメランチ類(フタバガキ科の*Shorea*属*Rubroshorea* 節)の関税率が最も高く、イエローメランチ類(*Shorea*属*Richetioides* 節)等の他の合板木材樹種の関税率が低いことにあると推定され、木材の樹種識別への需要が高まっている。

本研究では、東南アジア地域から日本に輸入されている木材樹種の変化を調べることを目的として、2002年に主に東南アジアから日本に輸入された合板の表面単板(関税の識別対象)の樹種を識別した結果と、1991年に輸入された丸太の樹種を調査した結果とを比較した。現在、日本に輸入されている東南アジア産木材の60%以上が合板であることを考慮すると、日本に輸入される南洋材樹種のこの間の変化を把握できる。

試料と方法

試料として用いた合板は、約70の輸入者が輸入した合板のうちから主にインドネシア、マレーシアを原産とした8,638枚である。これらの輸入者が2002年に取り扱った合板の輸入量は合計5.07億 m^2 であり、同年の日本における合板の総輸入量6.08億 m^2 の83%を占めている。試料である合板の両外面両表面の木材について単板を対象として、木口、板目、柃目面の徒手切片を切り出して、定法に従ってプレパラートを作製し、光学顕微鏡で観察し、樹種を識別した。2002年と1991年の樹種の比較は地域ごとに行い、主にマレーシアのサラワク州とサバ州からの輸入された木材について行った。

結果と考察

2002 年にアジア地域から日本に輸入された合板の樹種

使用樹種を調査した合板の輸入元は、インドネシア(53.1%)、マレーシア(39.5%; サラワク 27.7%, サバ8.2%)、シンガポール(1.5%)、中国(1.5%)、韓国(1.4%)、他(3.0%)であった。表面にレッドメランチ単板を用いた合板の割合は、全体で55%以上を占め、インドネシアからの合板の59.2%、マレーシアからの合板の51.6%を占めていた。両国の地域別で見ると、インドネシアではカリマンタン地域から輸入されている合板でレッドメランチ使用率が71.4%に登っていたが、スマトラ地域からの合板では29.9%にとどまっていた。マレーシアから輸入された合板では、最も量の多いサラワク州から積み出された合板の52.5%にレッドメランチが使用されており、また、78.6%の単板でフタバガキ科樹木の木材が用いられていると推定された。サバ州から積み出された合板の47.0%にレッドメランチを使用されており、97.2%の単板にフタバガキ科樹木の木材が用いられていると推定され、イエローメランチ、カプールがそれぞれ8.52%、5.87%であった。

1991 年にアジア地域から日本に輸入された丸太の樹種

1991 年に検査された丸太の輸入元は、マレーシア (92.2%; サラワク 80.8%, サバ 11.4%)、パプアニューギニア(5.7%)、ソロモン(1.9%)、他地域(0.2%)であった。1991 年の輸入され、検査された丸太の 61.8%がレッドメランチであった。また、サラワク州から輸入された丸太の 71.7%がレッドメランチ、94.6%がフタバガキ科樹木の木材であった。レッドメランチ以外では、カプール、イエローメランチ、クルインがそれぞれ 8.8%, 5.3%, 5.1%を占めていた。

1991 年と 2002 年に輸入された木材樹種の比較

サラワク州から 1991 年に輸入された丸太と、2002 年に合板の表面材として輸入された樹種を比較してみると、レッドメランチの割合が 71.7%から 52.5%と大幅に低下しているのは明らかである。それに伴って、1991 年にはほとんど用いられていなかった、ニャトー、ゲロンガン、ビンタンゴール、ジョンコン、メダン、カンラン科樹木等といった非フタバガキ科樹木の使用率が増加している。木材に利用される樹木の種類は、その木が生えていた森林の状況を反映していると考えられる。これは、この数十年で東南アジアの森林で、フタバガキ科樹木の割合が減少し、フタバガキ以外の樹木を利用せざるを得ず、資源が不足してきていることが示唆している。

資源が減少したとはいえ、フタバガキ科樹木は東南アジア地域では最も重要な木質資源であり、適正な資源管理が必要である。木材に使用されている樹種を調べるということは、最も基礎的な科学的行為であり、森林の状況を監視していく上で非常に重要である。

文献

1. 日本森林技術協会. (2003) 森林ノート 2002, 東京.
2. 日本農林水産統計情報部. (2003) 日本木材需給統年報. 東京. 農林統計局.
3. 財務省 (2003). 日本貿易統計 2002.
4. Sudo S. Tropical timbers imported from the Asia and pacific regions into Japan. (1996) Identification of lesser-known species. In: Donaldson L. A., Singh A. P., Butterfield B. G (eds) Recent advances in wood anatomy. Whitehouse L. A. New Zealand Forest Research Institute Limited. pp139-142.

天然林からの生産される木質資源は将来二次林から生産される

—二次林から生産される木材の有用性、利用、樹種識別—

Lim Seng-Choon, Samsudin M & Gan Kee-Seng
マレーシア、セランゴール州、ケポン、マレーシア森林研究所
E Mail: limsc@frim.gov.my

はじめに

マレーシアは熱帯木材および木製品の最大の輸出国の一つで、2005年(MTC2006)の輸出額はRM215億（約6000億円）で、森林部門の収入は、国の収入の中で大きな位置を占めている。マレーシアには、森林資源の持続的な供給のために管理されている生産林は比較的広い面積が残されているが、近い将来、生産可能な森林は、すべて一度伐採された経緯のある二次林となる。二次林からの木材生産性は悪くなり、商業的価値の高い木材が少なくなると考えられている。

現在の森林資源

2005年のマレーシアの森林面積は1948万haで総面積のおよそ60%を占める(MTC2006)。そのうちの1439万ha、約74%は次世代の利益のために持続可能に管理されるべき永久保存林(PRF)である。マレーシアの森林面積の大半がフタバガキ林(約82%:1600万ha)で、他の主要な森林タイプは泥炭湿地林(7.8%)、マングローブ林(3%)、および植林地(7%)となっている(Table 1)。

二次林の蓄積

Cannonizado(1978)とPinnard(1995)は、二次林は非常に多様で、伐採によるインパクトによって、重要な樹種と量の生産を期待出来ないかもしれないと、報告している。二次林における蓄積と樹種の構成を評価するために、マレーシア森林研究所(FRIM)は、半島マレーシアのCentral Pahang州、JerantutのテカムTekam 保護林 において研究プロジェクトを行った。この研究サイトは約11,000haで、17～28年前に伐採されている。伐採以前は、このサイトはメランティmeranti (*Shore spp.*)とmeranti seraya (*Shorea curtisii*)から成り、150m³/ha以上の蓄積がある最も優れた森林であると、マレーシア資源調査 (MNI)によって分類されていた。

Table 1 マレーシアの森林タイプ

	Land area (million ha)	Inland dipterocarp forest	Swamp forest	Mangrove	Plantatio n forest	Total forest area	Forest area as % of land area
Peninsular Malaysia	13.16	5.40	0.3	0.10	0.08	5.88	44.7
Sabah	7.37	3.68	0.12	0.36	0.20	4.36	59.2
Sarawak	12.30	6.92	1.10	0.13	1.09	9.24	75.1
Malaysia	32.83	16.00	1.52	0.59	1.37	19.48	59.3

Source: MTC 2006

しかしながら、Tekamの研究サイトの研究結果は、二次林の生産力が衰えていることを示している(table 2)。Tekamの蓄積量は145m³/haと、NFI結果と比べて減少し、その生産力は貧弱な森林に区分される森林の生産力よりも低かった。しかしながら、Tekamでの研究における、樹木密度は382本/haと高く、パイオニア種のmahang puteh(*Macaranga hypoleuca*)とMahang Gajah(*Macaranga gigantea*)といった*Macaranga* 属の樹木が優先していた(Fig. 3)。これは、前回の伐採において林冠に大きなギャップが出来たことを意味している。これらのギャップは、光要求性の早成樹種が成長するのに適した環境であった。

木材利用 – 現在のシナリオ

現在、我が国における木材の利用方法は、(a) 木材がある限られた用途の特別に使われる、たとえば、ラバーウッド rubberwood (*Hevea brasiliensis*)は家具、バラウ・セランガンバトゥ balau (*Shorea spp.*)は構造物、化学処理されたケンパス kempas (*Koompassia malaccensis*)は屋根の小屋組など、(b) 例えば建築用として扱われる、特に決まった仕様用途はなく広葉樹として様々な目的に使用される、の大きく2つの主なカテゴリーに分類される。

こういった、特に決まった仕様用途はなく広葉樹として使用される場合が普通で、特に、低から中コストで住宅に利用される。2006年には、FRIMに840件もの樹種識別の依頼があったが、識別の結果は、マメ科の克蘭ジ keranji (*Dialium spp.*)、シノメトラ kekatong (*Cynometra spp.*)、ケンパス kempas (*Koompassia malaccensis*)、メンガリス tualang (*Koompassia excelsa*)、merbau (*Intsia palembanica*)が最も多く、フタバガキ科のバラウ balau (*Shorea spp.*)、チェンガル chengal (*Neobalanocarpus heimii*)、ダークレッドメランティ dark red meranti (*Shorea spp.*)、科ブール kapur (*Dryobalanops spp.*)、red balau (*Shorea spp.*)、ホペア merawan (*Hopea spp.*)、レサック resak (*Cotylelobium/Vatica spp.*)などが次いでいた。他に、比較的よく知られた樹種として、クスノキ科のビリアン・ウリン belian (*Eusideroxylon zwageri*)、メダン ngang、アカテツ科: bitis (*Madhuca utilis/Palaquium spp.*)、ニャトー nyatoh (*Palaquium spp.*)、カンラン科のケドンドン kedondong、ウルシ科のレンガス rengas (*Gluta/Melanochyla spp.*)や merpauh (*Swintonia spp.*)、あまり知られていない樹種としては、トウダイグサ科のperah (*Elateriospermum tapos*)、mahang (*Macaranga spp.*)、ブナ科のメンペニン mempening (*Lithocarpus/Quercus spp.*)、キワタ科のドゥリアン durian (*Durio and other genera*)、パンヤ kekabu (*Bombax spp.*)、センダン科のアグライア bekak (*Aglaia spp.*)、ヒメハギ科のクラントフィラム minyak berok (*Xanthophyllum spp.*)など、他にも多くの科の樹種があった。

二次林からの木材

将来、天然林由来の木材供給源は二次林のみになる。そうになると、樹種構成的にはフタバガキ科樹木が減り、1回目の伐採で切り残されたニクズク科 (penarahan)、アオギリ科 (kembang semangkok)、クワ科 (keledang)、ブナ科 (mempening)、トウダイグサ科 (perah, mahang)、カンラン科 (kedondong)、クスノキ科 (medang)、フトモモ科 (kelat)等の多くの樹種が含まれる木材となる (Fig. 3)。木材の材質は、一回目の伐採時に生産された木材のものほど良くないであろう。その結果、製材品は、(a) 短尺で、(b) 割けやすく、(c) 多くの未成熟部分を含むため、高い収縮率を示し、(d) 樹種構成が増えるため、材質や密度にばらつきが多くなり、(e) 辺材部分が増加するため、菌や昆虫による影響を受けやすい、等の欠点が多くなる。

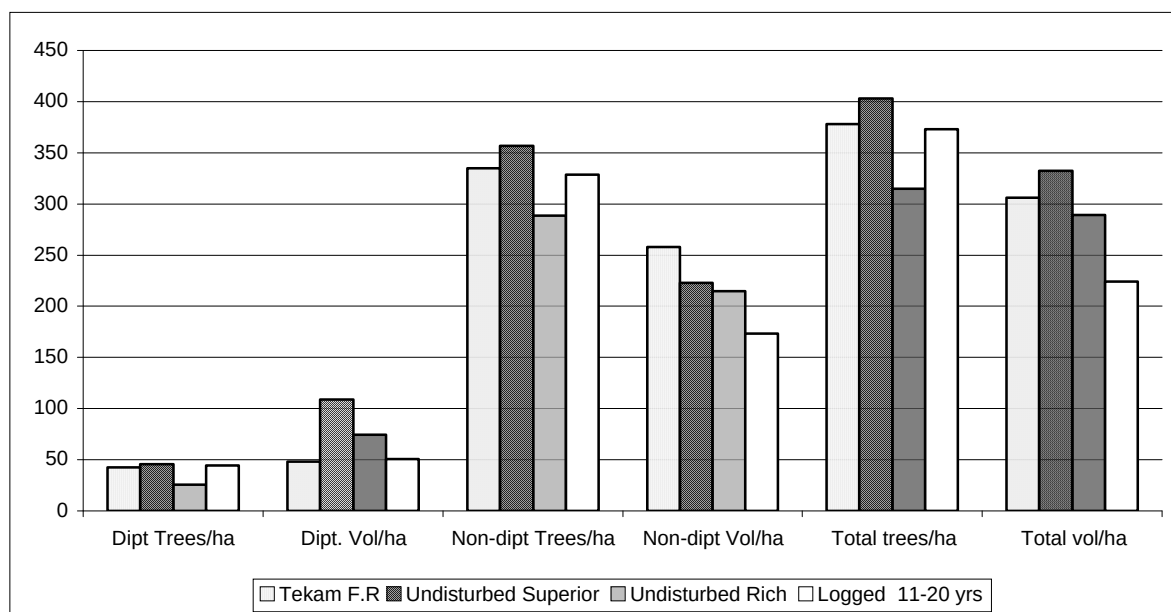


Figure 1 テカム保護地域と他の森林タイプとの樹種構成の比較

Table 2 テカム保護地域の第2回伐採期における樹種グループと直径区分の蓄積

樹種グループ	直径級別の蓄積 (m³/ha)					
	>15 cm	>30 cm	>45cm	>60cm	>75cm	>90cm
フタバガキ科	29.18	26.30	20.70	14.91	8.21	3.64
非フタバガキ科	34.11	29.07	20.04	12.75	6.43	2.50
非市場材	81.52	58.77	29.02	14.20	5.57	2.14
合計	144.80	114.14	69.75	41.86	20.21	8.29
	直径級別の密度 本/ha					
	>15cm	>30cm	>45cm	>60cm	>75cm	>90cm
フタバガキ科	43.56	20.25	7.50	2.60	0.97	0.27
非フタバガキ科	80.90	24.94	7.57	2.25	0.51	0.11
非市場材	257.34	62.63	15.09	3.15	0.85	0.14
合計	381.79	107.82	30.15	8.00	2.33	0.52

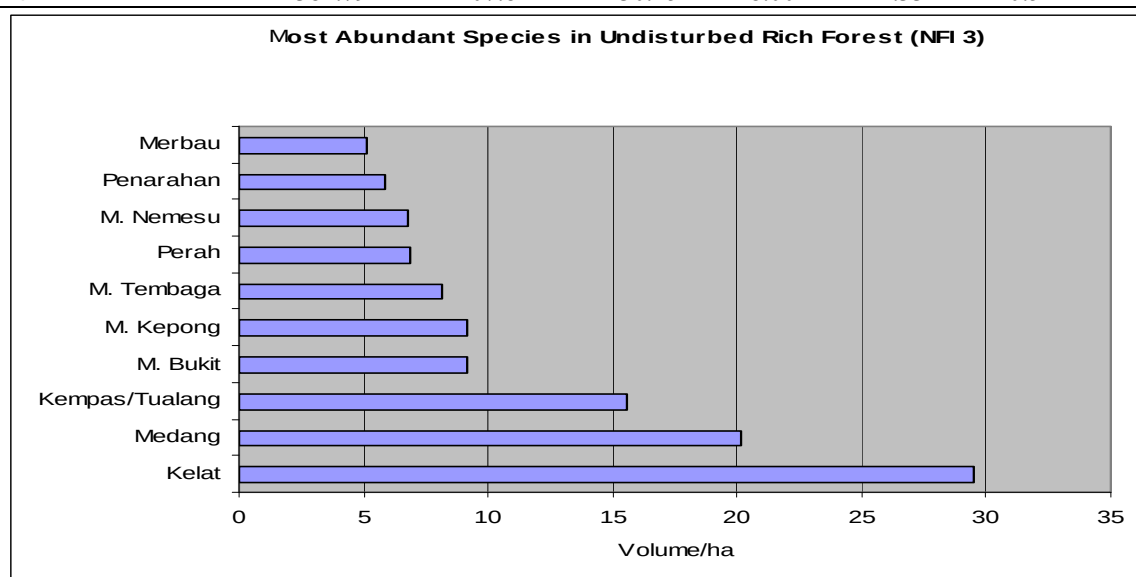


Figure 2 攪乱を受けていない森林における最も豊富な樹種

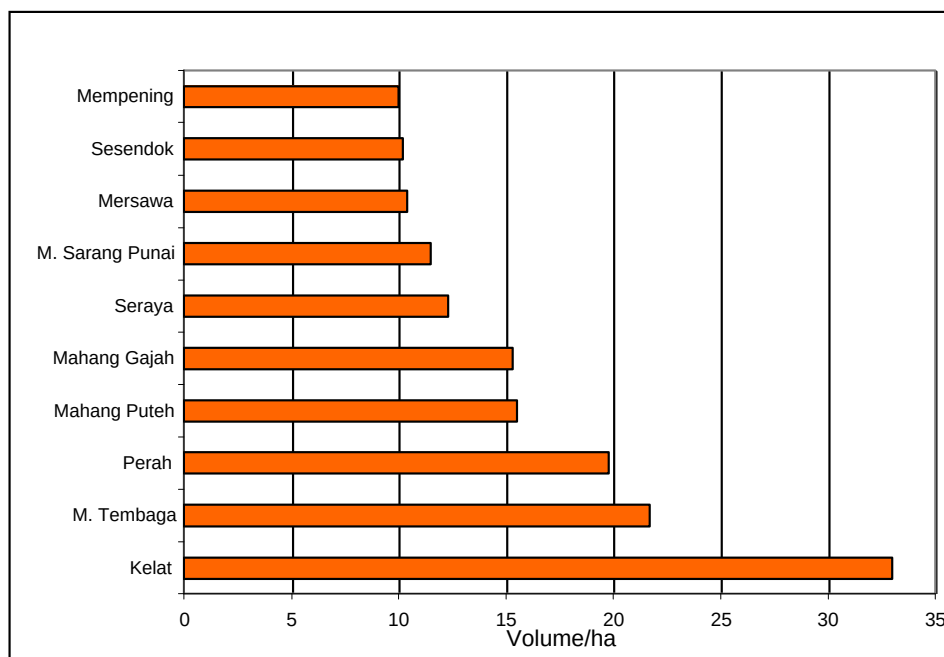


Figure 3 テカム森林保護地域における最も材積の大きな樹種

二次林から生産される木材の樹種識別

森林における樹木の樹種識別は、通常、訓練を受けた森林官やレンジャーによって容易に行われる。しかしながら、木が伐採されると、その木材の樹種や起源を特定することは、容易ではない。丸太の土場の管理者は樹皮の外観などを見て識別することなどの訓練を受ける必要がある。付録1に、二次林から多く生産される20樹種グループの特徴を示した。

結論

二次林における樹種構成は非常に高くなり、生産される木材の材積、材価も低くなる。そのため、造林学的手法による生産性の向上や、効率的な利用方法を検討することが必要である。木材の歩留まりをあげるための新たな手法を検討していく必要がある。土場の管理官、品質管理従事者は、二次林から生産される木材の識別のための訓練が必要であり、そうすれば、木材はより適正に樹種グループごとに取り扱われるであろう。

文献

- APPANAH S. 2000. Trends and issues in tropical forest management: Setting the agenda for Malaysia. Pp 1-21.in Shamsudin S., Nur Hajar Z.S. & Khoo K.C. (eds) *Proceedings of the Conference on Tropical Forest Harvesting: New Technologies Examined*, Forest Research Institute Malaysia.
- CANONIZADO, J.A. 1978. Simulation of selective forest management regimes. *Malaysian Forester* 41:128-142
- ISMAL, H., WAN SHUKRI W.A, NUR HAJAR Z.S. & SAMSUDIN M. 2002. Species composition in logged-over forests: Does it changes? *Proceedings of the Malaysian Science and Technology Congress, 12-14 December 2002*. Kuching, Sarawak, Malaysia.
- LIM S.C., SAMSUDIN M & GAN K.S.2005. Lesser-known timbers as the future sources of lignocellulosic materials in Malaysia. *The Malaysian Forester* Vol. 68 (4): 217-228
- MENON P.K.B, revised by ANI, S & LIM, S.C. 1993. *Structure and identification of Malayan woods*. Malayan Forest Records No. 25, Forest Research Institute Malaysia, Kepong,

- Malaysia. 123pp
SAMSUDIN, M. ABD RAHMAN, K., ISMAIL, H., KHAIRUL NAJWAN A.J. & FLETCHER, C. 2004. Do we have a second cut in our production forest? Pp. 58-68 in Lee, S.S, Aminah H., Norini H., Lim S.C. & Lim H.F. (eds). *Conference on Forestry and Forest Products Research, 6-18 October 2003*. K. Lumpur, Forest Research Institute Malaysia
PINNARD, M.A. 1995. Carbon Retention By Reduced Impact Logging. Ph. D. thesis, University of Florida, USA
MTC. 2006. Fact Sheets Forestry and Environment. MTC
THANG, H.C. 1987. Forest management systems for the tropical high forests, with special reference to Peninsular Malaysia. *Forest Ecology and Management* 21:3-20.
WONG T.M. 1976. *Wood structure of the lesser-known timbers of Peninsular Malaysia*. Malayan Forest Records No. 28, Forest Research Institute Malaysia, Kepong, Selangor, Malaysia. 115pp.

Appendix 1

二次林から生産される木材のいくつかの特徴

No	Timber	Spot Characteristics
1	アグライア Bekak (<i>Aglaia</i> spp.)	心材は赤レンガ色から暗赤褐色、比重やや重い、道管は楕円形で、中程度の大きさ、2-4列の放射組織を持つが、肉眼では判別しにくい。
2	ビンタンゴール Bintangor (<i>Calophyllum</i> spp.)	心材は桃から赤橙色、比重はやや軽い、成長輪界柔組織の存在によって、成長輪は明瞭、道管は孤立し、放射方向や斜め方向に配列する、放射組織は非常に細く、肉眼では判別できない。
3	ダークレッドメランティ Dark red meranti (<i>Shorea</i> spp.)	心材は赤褐色から暗赤色で黄色がかった辺材との区別が明瞭、比重はやや軽い、道管はやや大きくから大きく配列に特徴はない、柔組織は通常は短い翼状、放射組織は中程度の太さで肉眼でも判別できる。白色の物質を含む同心円状の軸方向樹脂道が存在する。
4	ドゥリアン Durian (mainly <i>Durio</i> spp.)	心材は桃茶色から暗赤褐色、橙褐色、比重は軽から重、道管は大、柔組織は網状から階段状、放射組織の大きさには、太いものと細いものに2形化、傷害樹脂道がしばしば存在。
5	ケドンドン Kedondong (spp. of <i>Burseraceae</i>)	心材は桃茶色から赤褐色、比重は軽から重、道管は小から中で、孤立するものが多い、柔組織は不明瞭か発達しない。
6	Kelat (<i>Eugenia/Syzygium</i> spp.)	心材は灰色から褐色、風化すると暗褐色、比重は中から重、道管は小から中で一般的に角張り、ほとんど孤立するが複合するものもある、柔組織は斜配向の翼状時に連合翼状、放射組織は細く、色の変化がないため、肉眼では判別しにくい。
7	アルトカルプス Keledang (<i>Artocarpus</i> spp.)	心材は黄橙色から黄褐色、金褐色、道管は中からやや大、少ないが一樣に分布、柔組織は周囲状、翼状、連合翼状で、木材中の柔組織は全般的に橙色。
8	ネオナウクレア Kelempayan (<i>Neolamarckia cadamba</i>)	心材は白色で風化とともに淡黄色、道管は主に放射方向に複合、柔組織は散在。
9	スカフィウム Kembang semangkok (<i>Scaphium</i> spp.)	心材は黄褐色から明褐色、成長輪界柔組織の存在によって、成長輪は明瞭、道管は中からやや大で少ない、孤立と放射方向の複合が存在、柔組織は周囲状、翼状、連合翼状や不規則な間隔の帯状も存在、傷害樹脂道がしばしば存在。
10	マカラング Mahang (<i>Macaranga</i> spp.)	心材は桃色がかった明黄色、道管は小から中程度、少なく複合する、柔組織は翼状で連合翼状から帯状になる傾向がある、放射組織は細い。

11	メダン Medang (spp. of Lauraceae)	心材は小麦色からオリーブ緑色、道管は小から中程度で、多くは複合、柔組織はまばら。
12	メンピサン Mempisang (spp. of Annonaceae)	心材は緑、桃色がかった明黄色、はだ目は粗で一様でない、道管は中程度、柔組織は細い帯として放射組織との間に階段状をなす、放射組織は2形化しすべての断面において目立つ。
13	メンペニン Mempening (<i>Lithocarpus/Quercus</i> spp.)	心材は黄褐色または赤褐色、道管は中からやや大で、孤立し、放射方向に配列、柔組織は規則的な間隔の帯状、放射組織は単列と広放射組織の二形化、柾目面に斑状。
14	Merpauh (<i>Swintonia</i> spp.)	心材は灰色から赤褐色、板目面に成長輪歪、道管は中から大で少ない、柔組織は不規則な間隔の帯状、明色の放射組織と帯状柔組織は暗色の心材部と明瞭に区別できる。
15	クサントフィルム Minyak berok (<i>Xanthophyllum</i> spp.)	心材は白色から明黄色、風化と主に暗黄色、道管は孤立、大径で少、柔組織は周囲状、翼状、連合翼状、独立柔組織は細く、規則的な間隔の帯状、放射組織は細く肉眼では判別できない。
16	ペナラハン Penarahan (spp. of Myristicaceae)	心材は青褐色から桃褐色、時に中心部が暗色、不規則な間隔の帯状柔組織によって成長輪が明瞭、道管は放射方向に複合することが多い。
17	Perah (<i>Elateriospermum</i> <i>tapos</i>)	心材は帯桃褐色、中心部は暗色で硬い、道管は中程度で少なく、孤立と放射方向に複合する、チロース存在、黄白色の沈着物が見られる、柔組織は規則的な間隔の細い帯状。
18	プライ Pulai (<i>Alstonia</i> spp.)	心材は帯黄白色、道管は中程度で放射方向に3個以上複合、柔組織は不規則な間隔の帯状、板目面で乳跡が通常見られる。
19	レンガス Rengas (<i>Gluta/Melanochyla</i> spp.)	心材は暗赤色で縞を有し、明褐色の辺材とは明確に区別できる、板目面で成長輪が歪となる、道管は中程度で、孤立するものと複合するものからなる、チロースは発達し、柔組織は不規則な間隔の帯状で、随伴柔組織は道管の境界部に数細胞列。
20	セッセンドック Sesendok (<i>Endospermum</i> <i>diadenum</i>)	心材は帯緑明黄色、道管は大、通常は放射方向に複合、柔組織は規則的な間隔の帯状、放射組織は肉眼で判別が可能。

Sources: Menon, revised by Ani S & Lim S.C (1993) & Wong T.M (1976)

インドネシアにおける伐採樹種と樹種識別（仮題）

Sri Nuguroho Marsoem

Vice Dean, Faculty of Forestry, Gadjah Mada University

ガジャマダ大学林業学部副学部長、ジョクジャカルタ、インドネシア

Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

e-mail: nugroho@idola.net.id

マレーシアの *Neobalanocarpus heimii* の個体識別のための DNA フィンガープリントデータベース

S.L. Lee and L.H. Tnah

マレーシア森林研究所、Kepong, 52109 Selangor Darul Ehsan, Malaysia

E-mail address: leesl@frim.gov.my; Tel.: +603 62797145; Fax: +603 6279 7856

違法伐採はマレーシアの森林生態系の持続性にとって大きな脅威となっている。林業家は盗難の疑いのある材木とそのもとの木を結びつけるものとして木材解剖学的な証拠に頼らざるを得ない現状であるが、これは決定的な証拠とはならない。

本研究はモデル的に *Neobalanocarpus heimii* を用いて犯罪科学の応用のために植物の DNA フィンガープリント法における DNA マーカーの利用を目的としたものである。*N. heimii* の個体識別のための網羅的なデータベース構築のために、27 の森林保護区で 30 の天然林集団を見だし、マレー半島全体から 1081 個体を収集した。

フタバガキ科樹木で開発された 51 遺伝子座のマикроサテライトマーカーを *N. heimii* で評価し 12 遺伝子座が使用可能であることを明らかにした、そして、それらは特異的な PCR 増幅を示し、null 対立遺伝子がなく、単一の遺伝子座支配で、一塩基繰り返し配列がなかった。アサインメントテストを用いたクラスター解析と遺伝距離の結果では 30 集団を 3 つの遺伝的なグループに分けることができた。それらは 3 つの地域 (A 地域 (西部)、B 地域 (中部と南部)、C 地域 (北東部)) と一致した。構築した *N. heimii* の DNA データベースは集団、地域及びマレー半島のそれぞれのレベルを特徴づけるものであった。独立性の検定の結果、ほとんどの遺伝子座が集団の部分構造や近親交配の影響でハーディーワインベルグ平衡から有意にずれていた。そのため *N. heimii* の一致確率を共通祖先係数 (θ) と近交係数 (f) で補正した部分構造-近親交配モデルを用いて算出した。保守性テストの結果、地域とマレー半島の両データベースとも保守性が高くマレー半島全体を通して *N. heimii* の遺伝子型及び対立遺伝子頻度を予測するのに十分なものであった。この識別能力は極めて高く、0.9999999999999999 以上あり、このマレー半島データベースは *N. heimii* の違法伐採者に対する裁判のための法的な証拠を提供できるものである。

今回構築した *N. heimii* の総合的な DNA フィンガープリントデータベースは熱帯植物では最初の報告で、マレーシアの他の重要な樹木の研究のモデルとして活用が期待される。マレーシアの重要な樹木種の多くための DNA フィンガープリントデータベースの有効性は違法伐採問題を抑制することで森林局の能力を増強させるであろう、またマレーシアの森林資源の保全や持続利用を間接的に保証することになるであろう。

葉緑体 DNA を用いたインドネシアの *Shorea* 属の 4 種の地理的起原の同定

Sapto Indrioko

ガジャマダ大学林業学部、ジョクジャカルタ、インドネシア

E-mail: sindrioko@ugm.ac.id

要旨

カリマンタン及びスマトラ集団起原である *Shorea* 属の 4 種、*S. leprosula*, *S. parvifolia*, *S. ovalis*, *S. johorensis* について葉緑体 DNA 変異を調査した。葉緑体のハプロタイプ変異は低く、*S. leprosula* と *S. ovalis* は全く変異がなかった。7 つのハプロタイプがあり、それらは種間で異なっていた。*Shorea* 属の種の系統地理的な構造は明瞭ではなかった。西カリマンタンの *S. parvifolia* と東カリマンタンの *S. johorensis* の 2 つのハプロタイプは特異的なものであった。

はじめに

Shorea 属はアジアの湿潤熱帯域では最も重要な林業樹種の一つである。フタバガキ亜科の仲間として、194 種からなる *Shorea* 属の天然分布はスリランカ、インド、ミャンマー、タイのインドシナ半島におよび、マレー地域 (マレーシアとインドネシア、フィリピン、ニューギニアを含む植物学的地域) には 163 種存在している [1]。ジャワを除き、この属のほとんどの種は Wallace 線の西側に分布している、カリマンタンに 137 種、スマトラに 50 種、一方、Wallace 線の東側では *Shorea* 属の種は劇的に減少し、スラウェシにわずか 1 種とモルッカ諸島に 3 種しかない [1, 2]。他の属と比較すると、*Shorea* 属はカリマンタンの低地フタバガキ雨林で最も繁栄している樹種であり、その森林の多様性の 12.3% を占めている [3]。

これまでの報告では *S. leprosula* でアイソザイム変異が例外的に高い値 (ヘテロ接合度、 $He=0.41$) を示している。マイクロサテライトマーカーを用いた他の調査では、*Shorea* 属の高いヘテロ接合度が明らかになっている、*S. leprosula*、 $He=0.69-0.71$ [5, 6, 7], *S. ovalis*、 $He=0.62-0.67$ [6], *S. curtisii*、 $He=0.68-0.73$ [8], *S. parvifolia*、 $He=0.33-0.85$ 、*S. acuminata*、 $He=0.42-0.76$ [9]。

Shorea 属は広域の天然分布をもつが、インドネシアの森林伐採や過度の森林開発はその多様性を減少させ、天然林の特異的な遺伝的変異を消滅させる可能性がある。森林伐採はまた他殖率の減少させる原因ともなり、近交弱勢を引き起こし、将来の世代の遺伝的変異性を減少させるかもしれない [8]。

ほとんどの被子植物の葉緑体 DNA は母性遺伝であることが分かっている [10]。本研究ではカリマンタンとスマトラの *Shorea* 属の樹種のハプロタイプの多様性を葉緑体 DNA を用いて調査した。本研究はまた *Shorea* 属の種の葉緑体 DNA ハプロタイプの地理的な分布のマッピングを示すためと、それぞれの個体の地理的な起原を証明するために道具としての分子マーカーの可能性を調査する初期的な方法である。

材料と方法

本研究では *Shorea* 属の 4 種を調査した、それらは *S. leprosula* Miq., *S. parvifolia* Dyer, *S. ovalis* (Korth.) Blume, *S. johorensis* Foxw である。これらの種は東南アジアに広域分布する理由で選んだ。インドネシアではこれら 4 種はスマトラとカリマンタンに分布する [1]。

材料はカリマンタンの 4 か所、スマトラの 1 か所から集めた。カリマンタンのサイトは地理的に離

れていることを選んだ。それぞれの種は1カ所につき6個体からなっている。スマトラではJambiのTebo天然林の成木から葉組織を採取した。カリマンタンの集団では天然林から種子を採取した。

表1 カリマンタンとスマトラで採取したサンプルの集団の場所

種	地理的な位置	
	緯度	経度
<i>S. leprosula</i> and <i>S. parvifolia</i>		
• West Kutai, East Kalimantan	0°00'–0°45' S	115°30'–115°45' E
• Muara Teweh, Central Kalimantan	0°00'–0°20' S	114°30'–115°10' E
• Ketapang, West Kalimantan	1°00'–1°15' S	110°45'–111°00' E
• Tebo, Jambi, Sumatra	1°00'–1°45' S	102°00'–102°45' E
<i>S. ovalis</i> (Korth.) Blume		
• Malinau, East Kalimantan	2°45'–3°21' N	115°48'–116°34' E
• Muara Teweh, Central Kalimantan	0°00'–0°20' S	114°30'–115°10' E
• Ketapang, West Kalimantan	1°00'–1°15' S	110°45'–111°00' E
• Tebo, Jambi, Sumatra	1°00'–1°45' S	102°00'–102°45' E
<i>S. johorensis</i> Foxw.		
• Malinau, East Kalimantan	2°45'–3°21' N	115°48'–116°34' E
• Muara Teweh, Central Kalimantan	0°00'–0°20' S	114°30'–115°10' E
• Ketapang, West Kalimantan	1°00'–1°15' S	110°45'–111°00' E

全DNAはDNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen GmbH, Hilden)またはCTAB法を用いて抽出した[11]。得られたDNAは50 ng λ DNA (Roche, Mannheim)を標準サンプルとして0.8%アガロース電気泳動で定量定性を行った。抽出したDNAはPCRの前に1-10%に希釈した。

フタバガキ科の系統関係の以前の調査[12]に従って、*S. leprosula*, *S. parvifolia*, *S. ovalis*及び*S. johorensis*の更なる集団遺伝解析のために葉緑体DNAのPCRプライマー及び制限酵素の3種類の組み合わせで行った、*rbcl* 遺伝子と *Alu I*と*Msp I*制限酵素、*petB* 遺伝子と*Rsa I*制限酵素。2つの葉緑体DNAの単純繰り返し配列のPCRプライマー (cpSSR)、*ccmp6*と*ccmp10*、もそれらの種の調査に用いた。PCR条件は以前の報告のものを多少変更して用いた[13, 14]。

制限酵素処理後、DNA断片は2.5%のアガロースゲルで電気泳動した。DNA断片長はDNA分子マーカーXIV (Roche, Mannheim)を基準として測定した。cpSSRは蛍光プライマー (6-FAM (青), HEX (緑) and NED (黄))を用いてPCR増幅したPCR増幅産物はABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いてキャピラリー電気泳動で分画した。この分画の際にGS 500 ROXをサイズスタンダーとして用いた。このcpSSRの長さの変異はGeneScan 3.7とGenotyper 3.7の分析用ソフトウェアを用いて分析した。

葉緑体DNAの多型領域の制限酵素サイトデータは更なる解析のために1、0データに変換した。制限酵素断片とcpSSRの長さの変異は多状態形質として符号化した。遺伝的多様性を調査するために、集団間の対立遺伝子変異の階層解析のために以下の計算を行った[15]。

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

ここで H_T は全体の集団の遺伝的多様性 $1 - \sum p_i^2$ と同じで、 H_S はそれぞれの集団内の平均遺

伝的多様性である、 p はそれぞれの集団のハプロタイプの頻度である。

結果

葉緑体 DNA ハプロタイプ変異

*S. leprosula*と*S. ovalis*は葉緑体DNA変異がなかった(それぞれハプロタイプA,B)。ハプロタイプ変異は*S. parvifolia*で3つ(C1、C2、C3)と*S. johorensis*で2つ(D1、D2)を見いだした。*S. parvifolia*の変異は*rbcL* 遺伝子と *Alu I*の組み合わせでみられ、cpSSRでは*ccmp6* (96-97 bp)と*ccmp10* (98-99 bp)でそれぞれ1塩基の違いがみられ、合計で4つのタイプが存在した。同様に*S. johorensis*では*rbcL* 遺伝子と*Msp I*制限酵素、*petB* 遺伝子と*Rsa I*制限酵素の組み合わせと*ccmp6* (96-97 bp)の1塩基違いがみられ、合計で3つのタイプが存在した。この研究でのハプロタイプ変異は低く、ハプロタイプ間の平均形質距離は0.0073-0.0292であった(表2,3)。

表2 *S. parvifolia*のハプロタイプ間の距離行列。形質の違い(斜め下)、平均形質距離(斜め上)。

ハプロタイプ	C1	C2	C3
C1	-	0.0219	0.0073
C2	3	-	0.0292
C3	1	4	-

表3 *S. johorensis*のハプロタイプ間の距離行列。形質の違い(斜め下)、平均形質距離(斜め上)。

Haplotypes	D1	D2
D1	-	0.0219
D2	3	-

集団間と集団内の遺伝的多様性

S. leprosula, *S. ovalis*, *S. parvifolia*及び*S. johorensis*では種間でハプロタイプを共有していなかった。それぞれの集団の種ごとのハプロタイプの分布を表4と図1-4に示した。*S. leprosula*と*S. ovalis*はどの集団にも葉緑体DNA変異は存在しなかった。*S. parvifolia*の集団間の分化は G_{ST} の値で0.15であった。西カリマンタンでは3つのハプロタイプがみられ、東カリマンタンではわずかに1つであった。他の集団から離れているJambi集団では2つのハプロタイプがみられた。カリマンタンの*S. johorensis*集団では G_{ST} の値が0.25であった。東カリマンタンの集団だけで1つ以上のハプロタイプがみられた。

表4 調査した*Shorea*属4種の集団ごとの保有するハプロタイプの個体数

Geographical Origin	<i>S. leprosula</i> A	<i>S. ovalis</i> B	<i>S. parvifolia</i>			<i>S. johorensis</i>	
			C1	C2	C3	D1	D2
East Kalimantan	6	6	6	0	0	4	2
Central Kalimantan	6	6	5	1	0	6	0
West Kalimantan	6	6	3	2	1	6	0
Jambi	6	6	5	1	0	-	-

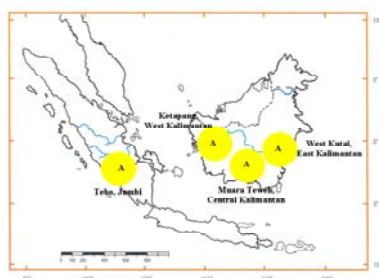


図 1. *S. leprosula* のハプロタイプ分布

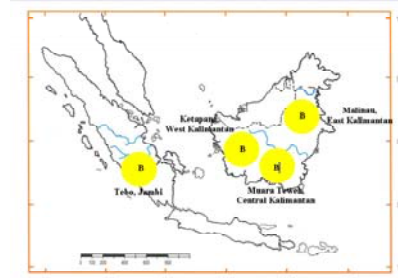


図 2. *S. ovalis* のハプロタイプ分布

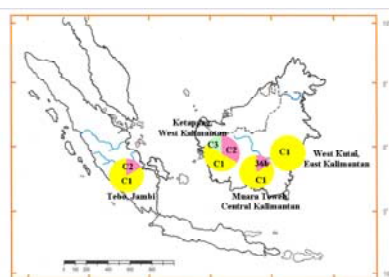


図 3. *S. parvifolia* のハプロタイプ分布

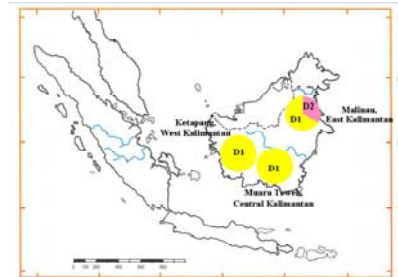


図 4. *S. johorensis* のハプロタイプ分布

考察

遺伝マーカーを用いて種の地理的な起原を再構築するために、葉緑体DNAのハプロタイプの解析は有効である。フタバガキ科のこれまでの系統解析結果に基づき、4つのcpDNAの遺伝子 (*rbcL*, *petB*, *psaA*, *psbA*)と2つのcpSSRの領域 (*ccmp6* and *ccmp10*)は*Shorea*属で多型であった[12]。本研究では*Shorea*属4種species (*S. leprosula*, *S. ovalis*, *S. parvifolia*及び *S. johorensis*)の4つの集団の解析で種間にハプロタイプの共有がないことが明らかになった。

*S. leprosula*と*S. ovalis*の集団では変異はなく、系統解析の結果でみられる同一種内では同じハプロタイプしか保有していなかった(ハプロタイプAと

B)。*S. parvifolia*の4つの集団では3つの異なるハプロタイプ変異(C1、C2、C3)がみられた。このハプロタイプの地理的な構造は明瞭ではなかった。カリマンタンで3つのハプロタイプがみられ、スマトラのJambiではわずかに2つのハプロタイプがみられた。*S. parvifolia*の*rbcL* 遺伝子と *Alu* Iの組み合わせ及び*ccmp6*と*ccmp10* では低い遺伝的変異(4%)であった。同様に*S. johorensis*の3集団での*rbcL* 遺伝子と*Msp* I制限酵素、*petB* 遺伝子と*Rsa* I制限酵素、*ccmp6* (96-97 bp)での遺伝的変異も低いものであった(3%)。わずかに2つのハプロタイプD1とD2が東カリマンタンでみられ、西及び中央カリマンタンでは1つのハプロタイプしかみられなかった。

調査した種は広域分布であり、*S. johorensis*と*S. ovalis*はカリマンタン、スマトラ、マレー半島に分布し、*S. leprosula*と*S. parvifolia*は前2種と同じ地域及びタイにも分布している。フタバガキ科の広域分布する属及び種はこれらの地域では白亜紀後期-第三紀前期に出現したと考えられている[16]。カリマンタンではフタバガキ科樹木は海拔0-2000mのあらゆる生息地である島の全ての地域で進化してきており、種分化は異なるニッチに適応したことで説明することは難しいと思われる[17]。理論的には、密接に関連した近縁種の起原は、直接的には相対的に少数の形質でのわずかな突然変異の結果であると考えられるかもしれないが、間接的には異なる植物組織の形態形成の必然的な変化の結果、他の多くの形質の変化を引き起こすことであるかもしれない[18]。これらの種の葉緑体DNAの進化を含めた進化段階を確かめるためには全ての天然分布域の観察が必要になる。

ハプロタイプの地理的構造はある種の天然分布によっていつも影響をうけるとは限らない。ヨーロッパの地域的な規模でのヨーロッパナラ[19, 20]、ヨーロッパブナ[21]でみられた種の系統地理学的な構造は、そのサンプルの起原とハプロタイプ分布との間の相互関係を示している。このような種で地理的な起原を調査する分子的な方法もまた開発されている[22]。一方、*Prunus spinosa* 集団の調査ではヨーロッパ大陸でのそれらのハプロタイプの系統と地理的な位置には不一致がみられている[23]。いくつかの熱帯の植物種の定着の歴史がハプロタイプの分布によって示されている、*Cedrela odorata*、中米の熱帯樹木で5つのハプロタイプがみられ、3つの異なる系統に分かれた[24]、一方、台湾と東アジアの*Cyclobalanopsis glauca*の集団では13のハプロタイプがみられ、派生した葉緑体DNA変異は台湾だけに限定されていたと結論づけている[25]。

引用文献

1. Ashton, P.S. 1982. Flora malesiana, series I – Spermatophyta, flowering plants, vol. 9, part 2, Dipterocarpaceae. Martinus Nijhoff. The Hague, Boston, London.
2. Maury-Lechon, G., Curtet L. 1998. Biogeography and evolutionary systematics of dipterocarpaceae, in: Appanah, S., Turnbull, J.M. (Eds.). A review of dipterocarps, taxonomy, ecology and silviculture. Center for International Forestry Research. Bogor.
3. Slik, J.W.F., Poulsen, A.D., Ashton, P.S., Cannon, C.H., Eichhorn, K.A.O., Kartawinata, K., Lanniani, I., Nagamasu, H., Nakagawa, M., van Nieuwstadt, M.G.L., Payne, J., Saridan, A., Sidiyasa, K., Verburg, R.W., Webb, C.O., Wilkie, P. 2003. A floristic analysis of the lowland dipterocarp forests of Borneo. J. Biogeography 30(10): 1517-1531.
4. Lee, S.L., Wickneswari, R., Mahani, M.C., Zakri, A.H. 2000. Genetic diversity of a tropical tree species, *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae), in Malaysia: implications for conservation of genetic resources and tree improvement. Biotropica 32(2):213-224.
5. Nagamitsu, T., Ichikawa, S., Ozawa, M., Shimamura, R., Kachi, N., Tsumura, Y., Muhammad, N. 2001. Microsatellite analysis of the breeding system and seed dispersal in *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). Int. J. Plant. Sci. 162(1):155-159.
6. Ng, K.K.S., Lee, L., Koh, C.L. 2004. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. Molecular Ecology 13: 657-669.
7. Rimbawanto, A., Isoda, K. 2001. Genetic structure of *Shorea leprosula* in a single population revealed by microsatellite markers, in: Thielges, B.A., Sastrapradja, S.D., Rimbawanto A. (Eds.). In situ and ex situ conservation of commercial tropical trees. ITTO Project PD 16/96 Rev. 4(F). Faculty of Forestry Gadjah Mada University. Yogyakarta.
8. Obayashi, K., Tsumura, Y., Ihara-Ujino, T., Niiyama, K., Tanouchi, H., Suyama, Y., Washitani, I., Lee, C.T., Lee, S.L., Muhammad, N. 2002. Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. Int. J. Plant. Sci. 163(1):151-158.
9. Takeuchi, Y., Ichikawa, S., Konuma, A., Tomaru, N., Niiyama, K., Lee, S.L., Muhammad, N., Tsumura, Y. 2004. Comparison of the fine-scale genetic structure of three dipterocarp species. Heredity 92:323-328.
10. Corriveau, J.L., Coleman, A.W. 1988. Rapid screening method to detect potential-biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. Am J. Bot. 75: 1443-1458.
11. Csai, U.M., Bastian, H., Brettschneider, R., Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., Scholz, F., Sperisen, C., Vornam, B., Ziegenhagen, B. 1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols; a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for generic evaluation and phylogenetic studies. Plant Mol. Biol. Rep. 16: 69-86.

12. Indrioko, S., Gailing, O., Finkeldey, R. 2006. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Indonesia based on chloroplast DNA. *Plant Sys. Evol.* 261:99-115.
13. Tsumura, Y., Kawahara, T., Wickneswari, R., Yoshimura K. 1996. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.* 93:22-29.
14. Weising, K., Gardner, R.C. 1999. A set of conserved primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
15. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323.
16. Awasthi, N. 1996. Dipterocarps in the Indian subcontinent: past, present and future, in: Appanah S., Khoo, K.C. (Eds.). *Proceedings of fifth round-table conference on dipterocarps.* Chiang Mai. 7-10 November 1994. pp. 138-156.
17. Meijer, W. 1974. Plant geographic studies on Dipterocarpaceae in Malesia. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61(3): 806-818.
18. Fedorov, A.A. 1966. The structure of the tropical rain forest and speciation in the humid tropics. *The Journal of Ecology* 54(1): 1-11.
19. Dumoline-Lapègue, S., Demesure, B., Fineschi, S., Le Corre, V., and Petit, R.J. 1997a. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European Continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
20. Petit, R.J., Csakl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrel, J., van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin- Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gilies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B. and Kremer, A. 2002b. Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
21. Demesure, B., Comps, B., and Petit, R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50(6): 2515-2520.
22. Deguilloux, M.F., Pemonge, M.H. and Petit, R.J. 2004. DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. *Annals of Forest Science* 61: 97-104.
23. Mohanty, A., Martín, J.P., and Aguinalalde, I. 2002. Population genetic analysis of European *Prunus spinosa* (Rosaceae) using chloroplast DNA markers. *American Journal of Botany* 89(8): 1223-1228.
24. Cavers, S., Navarro, C. and Lowe, A.J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology* 12: 1451-1460.
25. Huang, S.S.F., Hwang, S.-Y. and Lin, T.-P. 2002. Spatial pattern of chloroplast DNA variation of *Cyclobalanopsis glauca* in Taiwan and East Asia. *Molecular Ecology* 11: 2349.

研究プロジェクト「南洋材の樹種識別および産地特定の技術開発」の概要

藤井智之

多摩森林科学園・森林総合研究所:東京都八王子市

E-mail*: tfujii@ffpri.affrc.go.jp

木材の樹種とその産地を特定する技術は、市場における木材流通のモニタリングや制御のために必要であり、木材貿易規制の基盤となる技術である。森林総合研究所では、本研究プロジェクトを、2003年～2007年の5年間の計画で、サバ州森林研究センター (Forest Research Centre, Sabah: FRC) およびマレーシア森林研究所 (Forest Research Institute Malaysia: FRIM) の協力を得て実施してきた。

フタバガキ科(Dipterocarpaceae)の*Shorea*属は、東南アジアでは最も重要な木材生産樹種グループであり、木材解剖学的特徴に基づいて従来から4つのグループに区分され、その4グループは木材利用上の区分とも一致している。すなわち、レッドメランティ (Sect. *Rubroshorea*)、イエローメランティ (Sect. *Richetioides*)、ホワイメランティ (Sect. *Anthoshorea*)、そしてバラウ/セランガンバトゥ (Sect. *Shorea*) である。

*Shorea*属中でもレッドメランティ (Sect. *Rubroshorea*) は木材利用上で最も重要な樹種グループであり、その木材を他のグループから簡易に識別するための技術として、このレッドメランティがガリク酸を顕著に多く含有することに着眼して、TLC (薄層クロマトグラフィー) による検出を試みた。また、顕微鏡観察による木材解剖学的特徴による識別の基礎として、*Shorea*属の木材に共通の、同心円状配列の軸方向樹脂道、ベスチャード壁孔、不揃いな寸法の道管相互間壁孔等の他に、らせん肥厚状に配列したイボの存在を一部の樹種に見いだした。また、大径の水平樹脂道が一部の樹種に限られていることや軸方向柔組織および放射組織の異形細胞中の結晶の分布が確かに限られた樹種の特徴となることを明らかにし、レッドメランティを更に下位の樹種グループに識別できる可能性を示した。

葉緑体DNA塩基配列には個体群・分布地域間または種間の変異があり、マーカーとして活用できる。レッドメランティ (Sect. *Rubroshorea*) の34樹種104個体、イエローメランティ (Sect. *Richetioides*) の10樹種18個体、ホワイメランティ (Sect. *Anthoshorea*) 8樹種16個体、バラウ (Sect. *Shorea*) の13樹種24個体の葉緑体DNAの4領域 (約3,500bp) の分析結果に基づき、*Shorea*属を分子生物学的に分類した。同時に、DNA分析のためには、PCR (polymerase chain reaction) 法を用いて木材試料からDNAを抽出する必要がある。これまでの成果として、カマツ (*Larix gmelinii*) およびミズナラ (*Quercus crispula*) の辺材から、180℃まで加熱した場合でもDNAを抽出することに成功している。その結果、木材解剖学的特徴による識別とDNA分析とを合わせて、樹種レベルまでの識別の可能性が高くなった。

抽出成分や無機成分等の化学的なマーカーは、農産物の地理的産地の特定に使われてきており、木材の場合にも、遺伝的または生態的な背景で、成分組成や含有率比に地理的な変異が検出される可能性がある。酸素と炭素の安定同位対比 ($\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$) は供試木材の産地の緯度経度と密接な関係を持つことが明かとなったので、その測定結果に基づいて産地を絞り込める可能性がある。

心材抽出成分に基づくレッドメランチ類の識別

加藤 厚、菱山正二郎

森林総合研究所バイオマス化学研究領域

E-mail: katoat@ffpri.affrc.go.jp

緒言

*Shorea*はフタバガキ科の中では最も多く、経済的にも重要な属である。ホワイトメランチ、イエロメランチ、レッドメランチ、バラウ(セランガンバツ)に分類されるが、これらはそれぞれ *Anthoshorea*、*Richetioides*、*Rubroshorea*、*Shorea* の4つの節に相当する。わが国ではレッドメランチを用いた合板の関税率は他の樹種の合板より高いため、*Rubroshorea*節を簡単かつ迅速に判定する方法が求められている。

ケモタクソミーは化学分析の結果に基づいて植物を分類するものであるが、木材の化学成分は主要成分(セルロース、ヘミセルロース、リグニン)と溶剤で抽出可能な副成分(抽出成分)から成る。抽出成分は炭水化物、脂質、テルペノイド類、フェノール類、タンニン類、フラボノイド類から成り、通常それらの生合成は遺伝子によって支配されているため一定であり、ある種のみ存在する化合物もある。

*Shorea*属については、樹脂¹⁾や葉²⁾の分析に基づくケモタクソミーが行われており、樹脂中のセスキテルペンアルコールやトリテルペンの存在によって、*Anthoshorea*節が他の節と区別できることが知られている。しかし、*Shorea*属の心材抽出成分については、レスベラトロールオリゴマー類³⁾(Fig.1)や加水分解型タンニン関連成分⁴⁾(Fig.2)が単離されているものの、系統的なケモタクソミーに関する研究はほとんどない。

この研究においては、*Shorea*属における心材抽出成分の分布を明らかにし、簡易なレッドメランチ識別法を開発した。

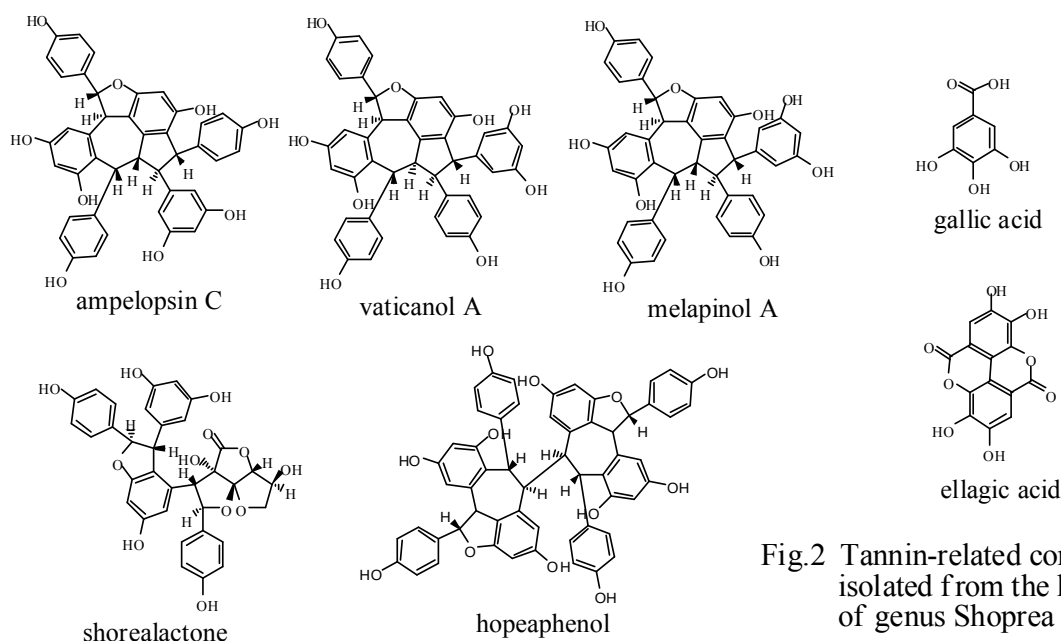


Fig.2 Tannin-related compounds isolated from the heartwood of genus *Shorea*

Fig.1 Resveratrol oligomers isolated from the heartwood of genus *Shorea*

クロマトグラフィーの手法の決定

心材抽出成分についての予備実験の結果、レスベラトロールオリゴマー類は*Shorea*属に広く分布するが、ガリク酸の存在はレッドメランチ類に限られることが示唆された。レスベラトロールオリゴマー類の構造は非常に複雑で、多くの異性体が存在するのに対して、ガリク酸(3, 4, 5-トリヒドロキシ安息香酸、没食子酸)は単純なフェノール酸で、容易に入手可能である。ガリク酸は茶葉、オークの樹皮などの植物に遊離、あるいはタンニンの構成成分として存在することが知られており、よい分類指標となる可能性がある。

薄層クロマトグラフィー(TLC)は一般的な分離手法であり、低コスト、試料調製が容易、融通性が高い、短時間で多くの試料を一度に分離できる、などの多くの利点がある。そこで、ガリク酸を検出するためのTLCの最適条件を検討した。シリカゲルTLCでは、ガリク酸はカルボキシル基やピロガロール基が固定相と相互作用を生ずるためか、テーリングを起こしやすかった。そこで、展開溶媒に相当量の酸を加えることによって、これを抑えることが可能であり、クロロホルム-酢酸エチル-蟻酸(5:4:1)で最適の結果が得られた。噴霧試薬としては塩化第二鉄が最適であり、ガリク酸はピロガロール基を有するため感度が高く濃青色に呈色したが、レスベラトロールオリゴマー類では呈色しなかった(Fig.3)。ガリク酸の検出限界はおおよそ0.2 μ gであった。

Shorea 属におけるガリク酸の分布

森林総合研究所の標本庫(TWTw)に保管されている標本の心材木粉を含水アセトンで抽出し、抽出物をTLC分析に供した。ホワイトメランチ、イエロウメランチ、バラウの試料ではガリク酸に相当するスポットは認められなかったが、レッドメランチについてはすべての試料でガリク酸の存在を示す濃青色のスポットが認められた(Table1)。ライトレッドメランチよりもダークレッドメランチのスポットの方が濃いことから、材色とガリク酸の関係が示唆された。ガリク酸自体は無色であるが酸化によって赤色になりやすい。レッドメランチにおけるガリク酸の存在は他の展開溶媒を用いたTLCや¹H-NMRスペクトルの結果からも確認された。

ガリク酸は実用的見地から適した識別指標であることが証明され、レッドメランチ識別のためのTLCの手法が開発された。フタバガキ科におけるケモタクソノミーによる分類を発展させるためには、*Shorea*属以外の植物におけるガリク酸の分布についても検討する必要がある。

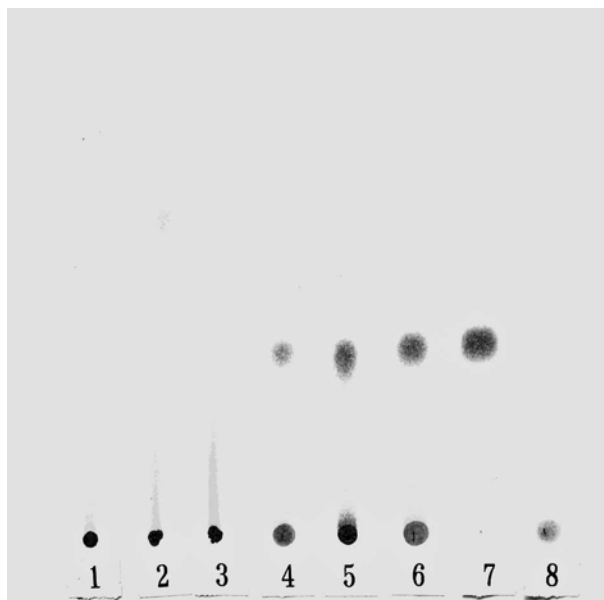


Fig.3 TLC of the heartwood extractives and the standard

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1: <i>S.hypochra</i> (White Meranti) | 2: <i>S.gibbosa</i> (Yellow Meranti) |
| 3: <i>S.laavis</i> (Balau) | 4: <i>S.polysperma</i> (Red Meranti) |
| 5: <i>S.negrosensis</i> (Red Meranti) | 6: <i>S.pauciflora</i> (Red Meranti) |
| 7: gallic acid | 8: shorealactone |

表1 *Shorea* 属におけるガリク酸の分布

ホワイトメランティ (<i>Anthoshorea</i>)	イエローメランティ (<i>Richetioides</i>)	レッドメランティ (<i>Rubroshorea</i>)	バラウ (<i>Shorea</i>)
<i>S. ochracea</i> -	<i>S. xanthophylla</i> -	<i>S. dasyphylla</i> +	<i>S. quadrinervis</i> +
<i>S. polita</i> -	<i>S. faguetiana</i> -	<i>S. parvistipulata</i> +	<i>S. negrosensis</i> +
<i>S. symingtonii</i> -	<i>S. gibbosa</i> -	<i>S. curtisii</i> +	<i>S. macroptera</i> +
<i>S. floribunda</i> -	<i>S. hopeifolia</i> -	<i>S. leprosula</i> +	<i>S. amplexicaulis</i> +
<i>S. gratissima</i> -	<i>S. patoensis</i> -	<i>S. pauciflora</i> +	<i>S. monticola</i> +
<i>S. hypochra</i> -	<i>S. illiasii</i> -	<i>S. amplexicaulis</i> +	<i>S. parvifolia</i> +
<i>S. philippinensis</i> -	<i>S. kudatensis</i> -	<i>S. almon</i> +	
<i>S. bracteolata</i> -	<i>S. multiflora</i> -	<i>S. gysbertsiana</i> +	
<i>S. agami</i> -	<i>S. mujongensis</i> -	<i>S. leptoclados</i> +	
<i>S. talura</i> -	<i>S. acuminatissima</i> -	<i>S. polysperma</i> +	
		<i>S. scabrida</i> +	
		<i>S. rubella</i> +	
			<i>S. inaequilateralis</i> -
			<i>S. kunstleri</i> -
			<i>S. venulosa</i> -
			<i>S. havilandii</i> -
			<i>S. gisok</i> -
			<i>S. teng</i> -
			<i>S. robusta</i> -
			<i>S. laevis</i> -
			<i>S. malibato</i> -
			<i>S. domatiosa</i> -
			<i>S. guiso</i> -
			<i>S. seminis</i> -

TLC を用いたレッドメランチの識別手法

- 1) 20mg の心材の鋸屑を 4ml の 70%含水アセトン(v/v)で攪拌しながら 10 時間抽出した後、濾過する。
- 2) 濾液を減圧下で濃縮・乾固させ後、残留物を 50 μ l のアセトンで溶解する。
- 3) 5 μ l のアセトン溶液（試料および標品のガリク酸）をガラスキャピラリーを用いて TLC プレート(Merck precoated Silica Gel 60F-254; 層厚 0.2mm)にスポットする。
- 4) プレートを展開溶媒としてクロロホルム-酢酸エチル-蟻酸 (v/v, 5:4:1) を入れたガラス容器に TLC プレートをつける。
- 5) 展開後、プレートを加熱し有機溶媒を除去する。
- 6) プレートを UV ランプの下に置き、蛍光の背景上に暗いスポットとして現れる UV 吸収のあるフェノール性化合物を検出する。
- 8) 塩化第二鉄（1%,メタノール溶液）をプレートに噴霧する。
- 9) ガリク酸のスポットが濃青色に呈色する。

文献

1. Norman G. Bisset, Viviane Chavanel, Jean-Pierre Lantz and Robert E. Wolff (1971) Constituents sesquiterpéniques et triterpéniques des résines du genre *Shorea*. *Phytochemistry* 10(10):2451-2463
2. Kunjani Joshi, G. Indrani Seneviratne and S. Priyangani Senanayake (2004) Leaf flavonoid aglycone patterns in the species of Dipterocarpaceae in Sri Lanka. *Biochemical Systematics and Ecology* 32(3):329-336
3. Yoshio Hirano, Ryuichiro Kondo and Kokki Sakai (2001) Compounds inhibitory to rat liver 5 α -reductase from tropical commercial wood species: resveratrol trimers from melapi (*Shorea* sp.) heartwood. *J Wood Science* 47(4):308-312
4. Yoshio Hirano, Ryuichiro Kondo and Kokki Sakai (2001) Novel stilbenoids isolated from the heartwood of *Shorea laevifolia*. *J Wood Science* 49(1):53-58
5. Om Prakash Sharma, Tej Krishan Bhat and Bhupinder Singh (1998) Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *J. Chromatography A* 822(1):167-171

Red meranti 木材の顕微鏡による識別拠点

安部 久^{1)*}、藤井智之²⁾
森林総合研究所 木材特性研究領域
e-mail*: abeq@affrc.go.jp

緒言

現在、科学的に木材を識別するには、目視や顕微鏡を用いて、木材を構成する細胞の形態や分布・配列等を基準にしているが、その精度は、多くの場合、植物学的な属レベルまでの識別にとどまっている。本研究では東南アジア産材で最も重要な樹種グループの*Shorea*属*Rubroshorea*節(通称:レッドメランチ、レッドセラヤ、レッドラワン、一部のホワイトラワン)の木材を対象に、節以下の種またはグループまでの識別の可能性について、木材解剖学的な識別拠点を探索する。

試料と方法

森林総合研究所が所蔵する*Shorea*属*Rubroshorea*節の木材標本45種343個体の標本を光学顕微鏡で観察し、特に柔組織における結晶の有無および存在形態、木繊維の細胞壁厚、放射組織の形状について調べた。また、45種117個体(3個体/種、標本数が少ない場合は全ての標本)を対象にして、柁目面が観察可能な厚切片(L:10×R:10×T:3mm)を走査電子顕微鏡(SEM)で観察した。

結果

光学顕微鏡による観察

観察対象の343個体の内、結晶が存在する標本は235個体で、その内で放射柔細胞に結晶が存在する標本は133個体であった。放射柔細胞に結晶を有する樹種では、ほとんどの場合、軸方向柔細胞にも結晶を有し、結晶を有する約半数の個体では、放射柔細胞に結晶を有していない事が分かった。結晶はすべてが異形細胞中に存在していた(図1)。標本数の多い樹種については、(1)結晶が存在しないもの(2)結晶が軸方向柔細胞にのみ存在するもの(3)結晶が軸方向柔細胞と放射柔細胞に存在するもの、(4)樹種の特徴が見られないもの、に分けられた。

電子顕微鏡による観察

SEMによる観察では、特にイボ、らせん肥厚といった道管壁の修飾構造について、その存非、分布様式について樹種ごとの特徴を調べた。19種で道管壁にイボが認められ、21種でイボが認められなかった。また、5種では、認められた個体と認められない個体があった。イボの発達の程度は様々で、一部の樹種でイボが細胞壁内表面にらせん状に分布していた。それらの樹種には、内表面も隆起して、らせん肥厚になっている個体も存在した(図2)。

結晶の分布様式とともに、道管壁の修飾構造は、*Shorea*属*Rubroshorea*節の木材をそれ以下の単位に分類するのに有効な指標であると考えられる。

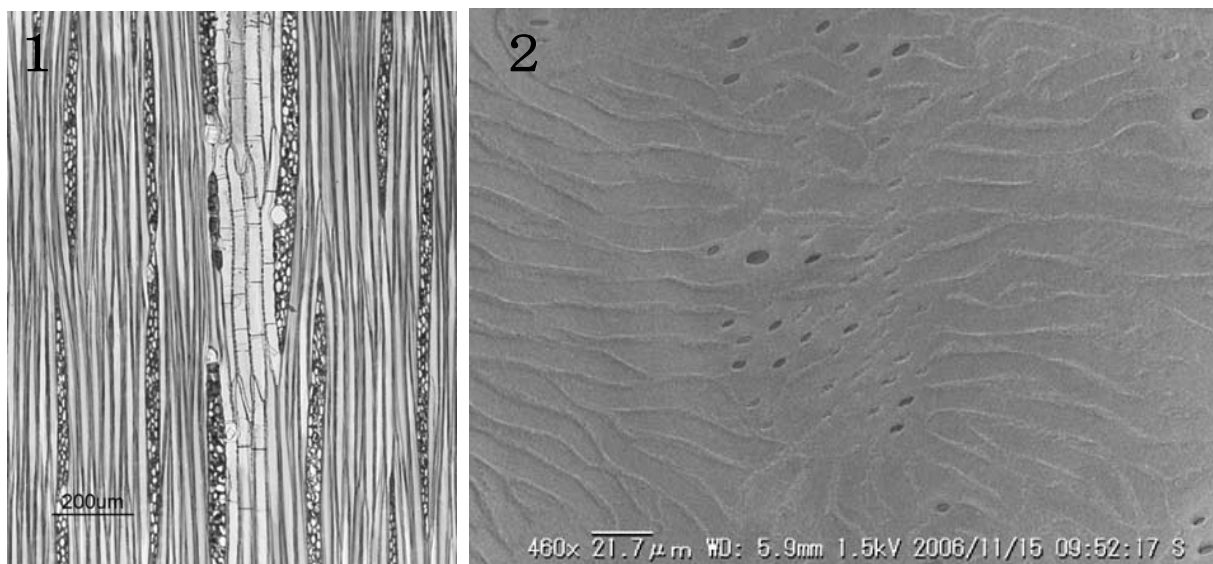


Fig. 1 光学顕微鏡、板目切片、異形細胞中の結晶

Fig. 2 SEM、道管内腔面のらせん肥厚上のイボ

木材片の樹種識別の実際

光学顕微鏡

- 1) 木材片から、木口、板目、柾目の三断面の切片をハンドナイフ、カミソリ刃などで切り出す。
- 2) スライドガラス上において、グリセリンを切片が完全に隠れる程度垂らし、カバーガラスをかけて、ホットプレート上で、120～150度で加熱する。
- 3) 温度上昇とともに、内部の水分が気化し気泡が出る。それとともに切片内の気泡が除去される。
- 4) 気泡の噴出が止まったら、プレパラートをホットプレートから外し、検鏡する。
- 5) レッドメランチの判定

木口面で同心円樹脂道

柾目面で不規則な道管放射組織間壁孔

シリカ存在しない

鎖状の結晶が存在しない

材色が赤い

小径の水平樹脂道が存在しない（大径の場合、*Shorea leprosula*, *S. ovata*, *S. teysmaniana*）

電子顕微鏡

- 1) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で3分間処理し、細胞壁内表面の細胞壁由来でない成分を取り除く。
- 2) 十分に水洗し、エタノールシリーズで脱水後、風乾する。
- 3) 未蒸着のまま、または導電性のある金属を蒸着して、走査電子顕微鏡(SEM)で観察する。
- 4) 道管壁の修飾構造を観察

表1 結晶の存在とイボ状層の存在による識別表

○：存在、×：存在しない、△：両方見られる、S：らせん状に分布するイボが存在

種名	結晶存在	放射柔細胞に結晶	イボ	木繊維壁厚
水平樹脂道を持つ樹種				
A ovata	○	×	△	thin-thick
teysmaniana	○	×	×	thin
leprosula	○	○	OS	thin
水平樹脂道を持たない樹種				
B kunstleri	○	○	○	thick
minor	○	○	○	thick
fallax	○	○	△	thin-thick
parvistipulata	○	○	△	thin-thick
andulensis	△	△	○	thick
C ovalis	△	△	△	thin
fallax	○	○	△	thin-thick
parvistipulata	○	○	△	thin-thick
macrophylla	○	○	OS	thin
almon	○	○	○	thin
joholensis	○	○	○	thin
palembanica	○	○	○	thin
D uliginosa	○	○	×	thick
pauciflora	○	○	×	thin-thick
E pauciflora	○	○	×	thin-thick
pinanga	○	○	×	thin
scabrida	○	○	×	thin
platycarpa	○	△	×	thin
amplexicaulis	△	△	×	thin
F platyclados	△	×	OS	thick
inaequilateralis	○	×	○	thick
andulensis	△	△	○	thick
G parvifolia	○	×	OS	thin
smithiana	△	×	○	thin
mecistopteryx	○	×	△	thin
ovalis	△	△	△	thin
H dasyphylla	○	×	×	thick
venulosa	○	×	×	thick
ferruginea	○	×	×	thin-thick
I ferruginea	○	×	×	thin-thick
ovalis	△	△	△	thin
argentifolia	○	×	×	thin
macroptera	○	×	×	thin
pilosa	○	×	×	thin
polysperma	△	×	×	thin
J andulensis	△	△	○	thick
bullata	×	×	○	thick
platyclados	△	×	OS	thick
albida	×	×	OS	thick
monticola	×	×	OS	thick
K smithiana	△	×	○	thin
curtisii	×	×	○	thin
scaberrima	×	×	○	thin
waltonii	×	×	OS	thin
ovalis	△	△	△	thin
L ovalis	△	△	△	thin
polysperma	△	×	×	thin
negrosensis	×	×	×	thin
beccariana	×	×	×	thin
palosapis	×	×	×	thin
quadrinervis	×	×	×	thin
rubella	×	×	×	thin

樹種識別のための木材からの DNA 抽出および遺伝子検出

吉田和正*、香川聡、西口満
森林総合研究所、茨城県つくば市松の里 1
*ykazu@ffpri.affrc.go.jp

要旨

木材や木材製品からの樹種識別にDNA分析技術の適用が考えられるが、そのためには分析に使用可能な量と質のDNAを木材から得なければならない。そこで、市販のDNA抽出キットを木材からのDNA抽出に適用できるように操作手順を改変した。試料として、由来および履歴が明確な日本産の木材を用い、放射方向の部位の違いや熱処理がDNA抽出効率とポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による遺伝子検出の難易に及ぼす影響を調べた。

辺心材の区別が明瞭な6樹種では、辺材からのDNA抽出効率は高い場合が多かったが、心材では低かった。辺心材の区別が不明瞭な4樹種では、外側の木部ほど効率よくDNAが抽出された。DNAの鎖長は主に250塩基対から2,000塩基対の範囲にあった。PCR法によって遺伝子の検出を試みたところ、3樹種の辺材と、辺心材の区別が不明瞭な3樹種の外側の木部から得られたDNAで葉緑体遺伝子(*rbcL*)、ミトコンドリア遺伝子(*cox1*)および核遺伝子(rDNA)が増幅できた。熱処理したグイマツとミズナラの辺材からのDNAは、140℃以上の温度では低分子化が進んでいたが、160℃までの処理ではグイマツ辺材のDNAから安定して遺伝子が検出できた。PCR阻害物質の影響を受けにくいPCR試薬を用いると、従来の試薬ではDNAを増幅することができなかった心材や辺材、180℃で熱処理したグイマツ辺材のDNAから葉緑体遺伝子を増幅できた。

緒言

木材の樹種識別には細胞構造の差異を観察する組織学的手法や木材に含まれる特徴的な抽出成分を分析する化学的手法が用いられているが、これらの方法だけでは種を識別することが困難な場合がある。

近年、進展が著しいDNA分析技術は、食品の原材料の判別¹⁾や犯罪捜査での個人の識別、親子鑑定²⁾などに利用されており、木材への適用も可能と考えられる。DNA分析を行うためには木材試料からDNAを得る必要がある。現在までに、土埋木や沈木、伐採木、標本、木材製品等の木部からDNAを抽出し、含まれている遺伝子を検出した例が報告されている³⁻¹⁰⁾。木材からのDNAの抽出効率と遺伝子検出の難易は、保存の状態や期間により違いがあることが報告されているが⁶⁾、木部の部位別のDNA抽出効率等を異なる科の木材について同時に比較した研究はなく、熱処理によってどう変わるかは不明であった。

そこで、木材や木材製品の樹種判定を想定し、木材の部位や熱処理がDNAの抽出効率とDNAの質に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、由来と履歴が明確な日本産の木材からDNAを抽出した。そして、得られたDNAからポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction、PCR)法による遺伝子検出の可否を検討した。さらに、遺伝子が検出できない心材や一部の樹種の辺材に由来するDNAについて、PCR阻害物質の影響を受けにくいとされる試薬が木材由来のDNAからの遺伝子検出に効果があるかどうかを調べた。

試料および実験方法

供試木材

10種の広葉樹および針葉樹を実験に用いた(表1)。木材の部位別のDNA抽出効率の検討には、幹の円盤より、樹皮から髓に達する楔状のブロックを切り出し、木部を放射方向に4分割した木片を用いた。辺材と心材の区別が明瞭な樹種では辺材と心材の境界で分けた後、心材を3等分した。辺材と心材の区別が不明瞭な樹種では木部を4等分した。熱処理には、グイマツ及びミズナラの楔状ブロックの木口面を外側から1 cmの厚さで除き、さらに2 mmの厚さで切り出した薄片を用いた。薄片は、60、100、140、160および180℃に設定したファン循環式乾燥器で5分間加熱した後取り出した。

表 1 木材試料の採取地

	樹種	採取年	採取地	標本番号 (TWTw)
ヤマグワ	<i>Morus australis</i> Poir.	2004	札幌	21871
エゾヤマザクラ	<i>Prunus sargentii</i> Rehder	2004	札幌	21795
ハクウンボク	<i>Styrax obassia</i> Sieb. et Zucc.	2004	札幌	21840
ミズナラ	<i>Quercus crispula</i> Blume	2004	札幌	21861
オノエヤナギ	<i>Salix udensis</i> Trautv. et C.A.Mey.	2004	札幌	21803
オニグルミ	<i>Juglans mandshurica</i> Maxim. var. <i>sieboldiana</i> (Maxim.) Makino	2004	札幌	21802
グイマツ	<i>Larix gmelinii</i> Rupr. ex Kuzen. var. <i>japonica</i> (Maxim. ex Regel) Pilg.	2004	札幌	21814
チョウセンゴヨウ	<i>Pinus koraiensis</i> Sieb. et Zucc.	2004	札幌	21832
モミ	<i>Abies firma</i> Sieb. et Zucc.	2004	札幌	21864
イチョウ	<i>Ginkgo biloba</i> L.	2004	札幌	21789

木粉の調製

のみとかなづちを使用して各木材試料を割り箸程度の太さに細割した後、さらに剪定ばさみでサイコロ状に切断した。それらの小木片を破砕機(マルチビーズショッカー、安井器械)を用いて粉末状になるまで破砕した。すなわち、50 mlポリカーボネートチューブ(ナルジェヌンク: 3117-0500)に小木片約1 gとメタルコーン(破砕媒体、安井器械:MC-5035PC)を入れ、ポリキャップ(安井器械:CP-5010)でふたをし、アルミスペーサー(安井器械:ALSP50(S))をつけて破砕機のサンプルホルダーにセットした後、最高振動数で10秒間破砕/10秒間休止のサイクルを5回から15回繰り返した。なお、木材を糸鋸で鋸断することにより木粉を調製することもできる。

DNA の抽出

DNAの抽出は、DNeasy Plant Mini Kit(キアゲン)およびDNeasy Plant Maxi Kit (QIAshredder Maxi Spin Columnのみ利用)を使用し、以下の手順で実施した。遠心分離操作はすべて室温(設定温度25℃)で行った。

- 1) 木粉 1 g を乳鉢に入れ、4 ml の AP1 バッファーを加えて膨潤させる。(寒冷時、AP1 バッファーは沈殿を生じている場合があるので、その場合には温めて溶解する。)
- 2) 乳棒で木粉を押し広げてから液体窒素を加えて凍結し、乳棒で微細粉末になるまで磨砕する。試料が解けてからもさらに約 5 分間すりつぶす。
- 3) 50 ml の遠心チューブ (スクリュウキャップ付コニカルチューブ) に葉さじの小さい方で移し、1 ml の AP1 バッファーでさじに付いた試料を洗い落とす。AP1 バッファーでバランスを取る。(選択: 8 μ L の RNaseA 溶液を加え、) 10 分間 65℃で保温する。
- 4) 1.625 ml の AP2 バッファーを加え、氷上に 10 分間置く。
- 5) 遠心機の最高回転数で 10 分間、遠心分離する。
- 6) その水層を QIAshredder Maxi Spin Column に入れ、バランスをとり、スイングローターを用いて最高回転数 (3,000～5,000 x g) で 5 分間、遠心分離する。
- 7) カラムを通り抜けた溶液を 15 ml の遠心チューブに移す。次に 5) で沈殿した木粉を葉さじ (小さい方) を使って、6) で使用した QIAshredder Maxi Spin Column に入れ、スイングローターを用いて最高回転数 (3,000～5,000 x g) で 5 分間、遠心分離し、カラムを通り抜けた溶液を 15 ml の遠心チューブに入れる。1.5 倍量の AP3/E バッファーを加え、混和する。
- 8) DNeasy Spin Column を吸引マニホールド (QIAvac 24 Plus) にセットし、7) で混和した溶液を約 650 μ l 加えてカラムを通す。この操作を繰り返す。(この過程を遠心法で行うこともできる。その場合は、DNeasy Spin Column に溶液を加え、6,000 x g (8,800 rpm) で 1 分間遠心分離し、通り抜けた溶液を捨てる。この操作を繰り返す。)
- 9) 0.6 ml の AW バッファーをカラムに加え、6,000 x g (8,800 rpm) で 1 分間遠心分離する。通り抜けた溶液は捨てる。
- 10) 0.5 ml の AW バッファーをカラムに加え、17,000 x g (15,000 rpm) で 5 分間遠心分離する。通り抜けた溶液は捨てる。
- 11) カラムを新しい 1.5 ml チューブに移し、0.1 ml の AE バッファーをカラムに加え、5 分間待つ。6,000 x g (8,800 rpm) で 1 分間遠心分離して DNA を溶出させる。この操作を再度行い、通り抜けた溶液を合わせて DNA 溶液を得る。

DNA 濃度および鎖長の測定

DNAの濃度は、蛍光分光光度計 (F-3010、日立工機) を使い、測定バッファー (10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5)、1 mM エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、0.1 μ g ml⁻¹ Hoechst33258 (インビトロジェン)) 1 ml に 2 μ l の DNA 溶液を混和し、励起波長 352 nm、測定波長 455 nm にて測定した。標準物質として既知濃度の λ DNA を使用した。DNA の鎖長は、DNA (250 ng) を 0.7% アガロースゲルを用いた電気泳動で分離後、臭化エチジウムで染色し、DNA サイズマーカーと比較することにより測定した。

PCR 法

葉緑体 DNA に存在するリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子 (*rbcL*)、ミトコンドリア DNA に存在するシトクロムオキシダーゼサブユニット 1 遺伝子

(*cox1*) および核DNAに存在するリボソームRNA遺伝子(rDNA)の内部転写スパーサー1領域を検出対象とした。各遺伝子の検出に使用したプライマーの配列を表2に示す。

rDNAの検出には以下の通り樹種により異なるプライマーの組み合わせを用いた。エゾヤマザクラ、ミズナラ、オノエヤナギおよびイチヨウ:rDNA-F1とrDNA-R1、ヤマグワおよびハクウンボク:rDNA-F2とrDNA-R1、グイマツ:LAITS1BとrDNA-R2、チョウセンゴヨウ:ITS1NとrDNA-R3。

PCRには2種類の試薬を用いた。一つはGoTaq Green Master Mix (プロメガ)で、反応溶液は、12.5 μ lのGoTaq Green Master Mix溶液に0.5 μ Mのプライマーおよび一定量のDNA(例:50 ngまたはDNA溶液5 μ l)を加え、滅菌水にて25 μ lに調製した。もう一つはPCR阻害物質の影響を抑える作用をもつAmpdirect Plus(島津製作所)で、12.5 μ lの2 x Ampdirect Plus溶液に0.25 μ l(0.625ユニット)のBlend Taq -Plus-(東洋紡績)、0.5 μ Mのプライマーおよび一定量のDNA(例:50 ngまたはDNA溶液5 μ l)を加え、滅菌水にて25 μ lに調製した。PCRは、95°C・90秒の変性に続き、95°C・30秒、56°C・30秒、72°C・50秒を35または40サイクルの条件で行い、反応終了後の溶液を0.7%アガロースゲルでの電気泳動により分析した。

表2 PCRに用いたプライマーの配列

プライマー名	配列(5' - 3')	文献
rbcL-F	GGACTTACCAGTCTTGATCG	(10)
rbcL-R	TCACATGTACCTGCAGTAGC	(10)
cox1-F	CGGTCTTCGGGTATCTAGGC	(10)
cox1-R	TCCATCCAGCGTAAGCATCT	(10)
rDNA-F1	GAACCTGCGGAAGGATCATTG	(10)
rDNA-F2	CGTGATGGGGATAGATCATTGC	(10)
LAITS1B	CCAAGGGCCTTGATCAT	(11)
ITS1N	CGTAACAAGGTTTCCGTAGG	(12)
rDNA-R1	AGTCCCGCCTGACCTG	(10)
rDNA-R2	CAGCGACAACAAGCAATGC	(10)
rDNA-R3	TCCCTTGACCCAACCACC	(10)

PCR 増幅 DNA の塩基配列解析

PCRで増幅されたDNAは、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(プロメガ)を用いて精製した後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとに公共のDNAデータベース(例:日本DNAデータバンク、<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)を検索し、最も高い相同性を示す遺伝子が由来した生物種と、DNAを抽出した木材の樹種を比較した。

結果および考察

木材からの DNA の抽出効率と DNA の質に及ぼす部位の影響

合板等の木材製品が製造されるときに、木材の部位は考慮されない場合が多く、製品には様々な部位が含まれる。そこで、木材の部位とDNA抽出効率の関係を明らかにするため、広葉樹6種、針葉樹4種について木部を放射方向に4つに区分し、DNAを抽出した(表3)。

DNA抽出効率は辺材と心材の区別が明瞭な樹種(ヤマグワ、エゾヤマザクラ、ミズナラ、オ

ニグルミ、グイマツ、チョウセンゴヨウ)では、オニグルミを除いて辺材の方が高く、心材ではいずれの樹種も低かった。辺心材の区別が不明瞭な樹種(ハクウンボク、オノエヤナギ、イチョウ、モミ)では、外側の部位の方が内側より抽出効率が高い傾向が認められた。これらの傾向は、本実験で試料とした樹種の中では広葉樹と針葉樹で共通していた。このように、辺心材の区別が明瞭な樹種では、心材からのDNA抽出効率は低く、また、不明瞭な樹種では、中心部に近づくにしたがい木材からのDNA抽出効率は低下した。

抽出したDNAの鎖長を、アガロースゲル電気泳動法で調べた(図1)。通常、若い葉から抽出したDNAは20,000塩基対(base pair, bp)程度の鎖長があるが、木材からのDNAの鎖長は、主に250 bpから2,000 bpの範囲にあり、DNAは低分子化していることがわかった。沈木および標本の木部から抽出したDNAの鎖長は、それぞれ125 bpから23,000 bp、50 bpから10,000 bpの範囲にあることが報告されており^{9,10)}、木材から抽出したDNAは一般に低分子化しているといえる。

表3 放射方向の部位の違いとDNA抽出効率

		DNA 抽出効率 ($\mu\text{g g}^{-1}\text{ wood}$)			
樹種		部位			
		外(樹皮)側	←→	内(髓)側	
ヤマグワ	<i>Morus australis</i>	13.9	<u>2.3</u>	<u>1.6</u>	<u>1</u>
エゾヤマザクラ	<i>Prunus sargentii</i>	8.3	<u>0.8</u>	<u>0.3</u>	<u>0.2</u>
ハクウンボク	<i>Styrax obassia</i>	7.5	6.1	5.2	<u>1.5</u>
ミズナラ	<i>Quercus crispula</i>	7.1	<u>0.8</u>	<u>0.4</u>	<u>0.3</u>
オノエヤナギ	<i>Salix udensis</i>	1.5	0.5	0.2	0.3
オニグルミ	<i>Juglans mandshurica</i> var. <i>sieboldiana</i>	0.3	<u>0.3</u>	<u>0.3</u>	<u>0.1</u>
グイマツ	<i>Larix gmelinii</i> var. <i>japonica</i>	17.2	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
チョウセンゴヨウ	<i>Ginkgo biloba</i>	4.2	2.4	1.4	<u>0.1</u>
モミ	<i>Pinus koraiensis</i>	1	<u>0.1</u>	<u>0.1</u>	<u>0</u>
イチョウ	<i>Abies firma</i>	0.5	1.2	0.1	0

下線は心材の値を示す(ハクウンボクとイチョウについては変色材の値を示す)

抽出されたDNAには、細胞核に存在するDNAだけでなく、葉緑体DNAやミトコンドリアDNAが含まれている。細胞あたりのコピー数が多い葉緑体やミトコンドリアDNAの遺伝子は、核DNAの大部分の遺伝子に比べ検出が容易である。また、葉緑体DNAの遺伝子は植物の系統解析に多用されており¹⁴⁾、ミトコンドリアDNAの遺伝子は動物種の判定に利用されている¹⁾。一方、核DNAでも、同じ配列が繰り返されコピー数が多いリボソームRNA遺伝子は

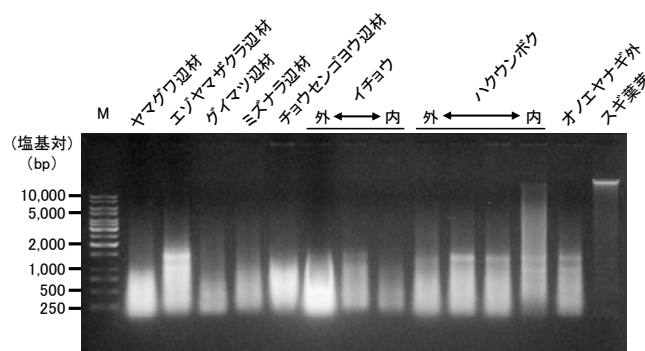


図1 種々の木材から抽出されたDNA

M: DNA サイズマーカー

外: 外側の木部、内: 内側の木部

検出しやすく、系統解析や親子鑑定に用いられている。そこで、辺材と、辺心材の区別が不明瞭な木材で一定濃度 ($1.4 \mu\text{g g}^{-1}$) 以上のDNAが得られた部位について、葉緑体遺伝子 *rbcL*、ミトコンドリア遺伝子 *cox1* および核遺伝子 *rDNA* をPCR法で増幅し、検出を試みた(図2)。その結果、辺心材の区別が明瞭な樹種の辺材では、*rbcL*、*cox1* および *rDNA* が検出された樹種(ヤマグワ、エゾヤマザクラ、グイマツ)と、どの遺伝子も検出されない樹種(ミズナラ、チョウセンゴヨウ)があった。辺心材の区別が不明瞭な樹種(イチョウ、ハクウンボク、オノエナギ)では、外側の部位からのDNAを用いた場合には各遺伝子とも検出されたが、内側の部位からのDNAではどの遺伝子も増幅されなかった。PCRで増幅されたDNAは、塩基配列の決定とDNAデータベースの検索から、DNAを抽出した木材にそれぞれ由来すると判断された。

以上の結果より、木材からDNA分析に使用可能な葉緑体、ミトコンドリアおよび核のDNAを抽出できることがわかった。しかし、樹種および部位によりDNAの抽出効率は大きく異なった。また、DNAが得られても遺伝子が検出できない場合があった。

木材への熱処理の影響

伐採された木材は加工の前に人工乾燥される場合がある。また、合板や集成材の製造工程では素材の乾燥や接着のため熱が加えられる。そこで、加熱が木材からのDNA抽出効率に及ぼす影響を知るため、グイマツおよびミズナラの薄片を熱処理し、辺材からDNAを抽出した。これらの樹種は合板の製造に使われるものと同種(ミズナラ)あるいは近縁種(グイマツはカラマツと同属)であることから選定した。グイマツ辺材からのDNA抽出効率は160℃までの処理では明瞭な違いが認められなかったが、180℃では低下した(図3A)。ミズナラにおいても、熱処理によるDNA抽出効率の低下が認められた(図3B)。抽出されたDNAの鎖長は、100℃以下の処理では無処理の木材と顕著な違いはなかったが、140℃以上では短くなり、DNAの低分子化が進んでいた(図4)。

それぞれの温度処理のグイマツ材から得られたDNAについて遺伝子の検出の可否を調べたところ、160℃までの処理木材からは *rbcL*、*cox1* および *rDNA* のいずれもが検出されたが、180℃では検出が不安定となった(図5)。これは熱処理によるDNAの分解・低分子化が進み、PCRによる遺伝子の増幅が困難になったためと考えられる。

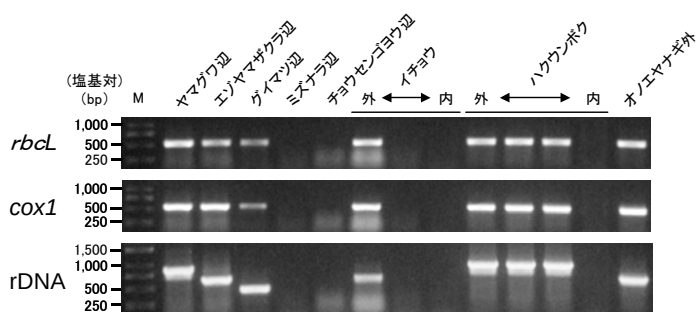


図2 種々の木材 DNA からの遺伝子の検出

M : DNAサイズマーカー

辺 : 辺材、外 : 外側の木部、内 : 内側の木部

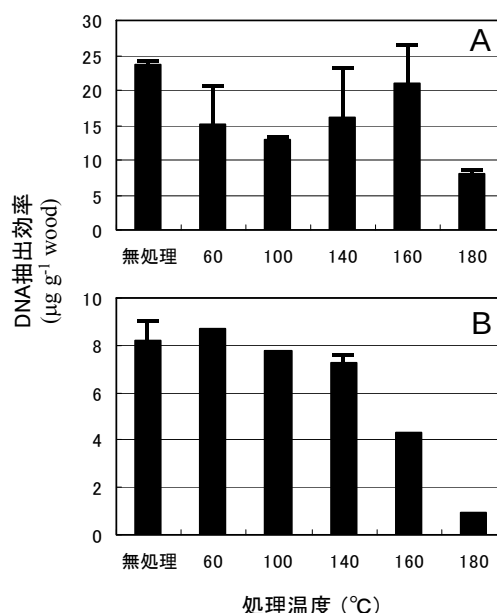


図3 熱処理した木材からの DNA 抽出効率

A : グイマツ (n=2)、B : ミズナラ 無処理、140℃ (n=2); 60, 100, 160, 180℃ (n=1)

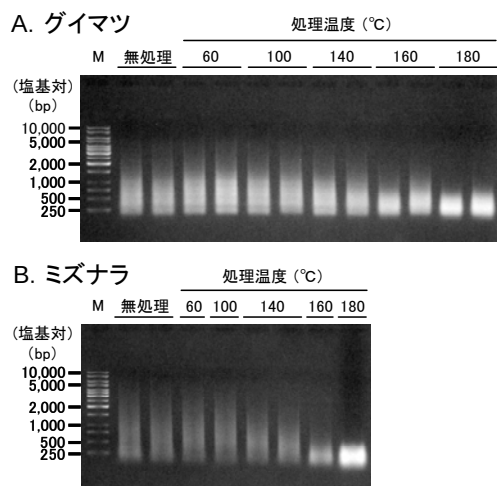


図4 熱処理した木材から抽出されたDNA

A: ギイマツ、B: ミズナラ
M: DNAサイズマーカー

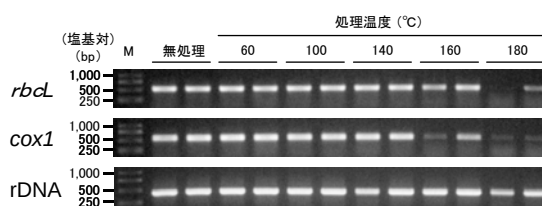


図5 熱処理したギイマツ材 DNA からの遺伝子の検出

M: DNAサイズマーカー

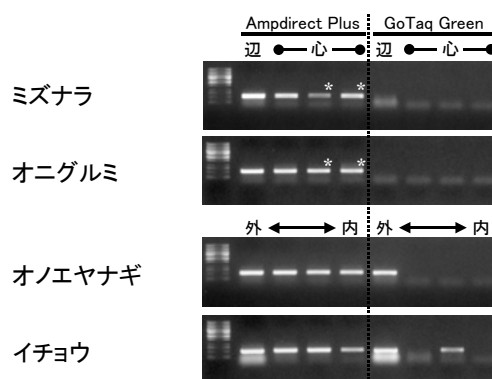


図6 放射方向に異なる部位の木部 DNA からの遺伝子の増幅における PCR 試薬の比較

アガロースゲル電気泳動の結果。

*: 混入した DNA に由来する *rbcL* の増幅

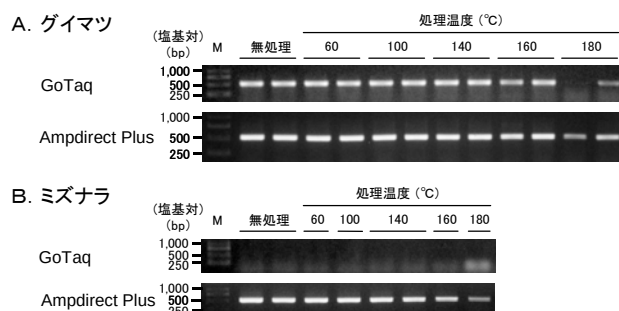


図7 熱処理した木材 DNA からの遺伝子の増幅における PCR 試薬の比較

アガロースゲル電気泳動の結果。M: DNAサイズマーカー

PCR 阻害物質の影響を抑制する試薬の効果

心材や一部の樹種の辺材、熱処理した木材からはDNAが増幅できない場合があり、その原因の一つとしてPCR阻害物質の存在や生成が想定された。そこで、阻害物質の影響を受けにくいとされるPCR試薬 (Ampdirect Plus) がそのような木材からのDNAの増幅に効果があるかどうかを検討した。

GoTaq Green Master Mix (以下GoTaqと略記) を用いたPCRではDNAを増幅することができなかったミズナラとオニグルミの辺材や外側の心材、および辺心材の区別が

不明瞭なオノエヤナギとイチヨウの内側の木部から抽出したDNAについて、Ampdirect Plusを用いると*rbcL*を増幅できた(図6)。

180℃で熱処理したギイマツ辺材より抽出したDNAからは、GoTaqでは*rbcL*が増幅されない場合があった。しかし、Ampdirect Plusを用いると安定した増幅が可能であった(図7A)。また、

GoTaqでは*rbcL*が増幅されないミズナラ辺材のDNAについても、Ampdirect Plusを用いることにより熱処理の有無にかかわらず*rbcL*が増幅できた(図7B)。

以上の結果から、Ampdirect Plusは、様々な樹種や部位の木材が使用されている木材製品からのDNAの増幅に有効であり、DNA分析による樹種識別に利用できる。

文献

1. 藤田 哲 (2003) 食品のうそと真正評価—消費者と公正な業者を守るために. エヌ・ティー・エス, 393p
2. 福島弘文 (2003) DNA 鑑定のはなし—犯罪捜査から親子鑑定まで—. 裳華房, 129p
3. De Filippis L, Magel, E (1998) Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in *Robinia* trees using RAPD-PCR. *Trees* 12(6): 377-384
4. Dumolin-Lapègue S, Pemonge M-H, Gielly L, Taberlet P, Petit RJ (1999) Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Mol Ecol* 8(12): 2137-2140
5. Ohyama M, Baba K, Itoh T (2001) Wood identification of Japanese *Cyclobalanopsis* species (Fagaceae) based on DNA polymorphism of the intergenic spacer between *trnT* and *trnL* 5' exon. *J Wood Sci* 47(2):81-86
6. Deguilloux M-F, Pemonge M-H, Petit RJ (2002) Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proc R Soc Lond B* 269(1495):1039-1046
7. Deguilloux M-F, Pemonge M-H, Petit RJ (2004) DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. *Ann For Sci* 61(1):97-104
8. Tani N, Tsumura Y, Sato H (2003) Nuclear gene sequences and DNA variation of *Cryptomeria japonica* samples from the postglacial period. *Mol Ecol* 12(4):859-868
9. Reynolds MM, Williams CG (2004) Extracting DNA from submerged pine wood. *Genome* 47(5):994-997
10. Asif MJ, Cannon CH (2005) DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Mol Biol Rep* 23(2):185-192
11. 吉田和正、香川聡、伊ヶ崎知弘、西口満、向井譲 (2006) 木材の部位、保存期間、熱処理が木材からの DNA 抽出効率と DNA の質に及ぼす影響. 森林総合研究所研究報告 5(4):289-298
12. Gernandt DS, Liston A (1999) Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Am J Bot* 86(5):711-723
13. Wei X-X, Wang X-Q (2004) Evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene and divergence of *Larix* (Pinaceae). *Mol Phylogenet Evol* 31(2):542-553
14. Soltis DE, Soltis PS (1998) Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ (eds.) *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 1-42

フタバガキ科 *Shorea* 属の樹種識別のための DNA データベースの構築

津村義彦¹・角友之¹・田口由利子¹・福江陽子^{2,9}・谷尚樹¹・吉村研介¹・上谷浩一³・
原田光⁴・竹内やよい⁵・Bibian Diway⁶・Reiner Finkeldey⁷・Soon Leong Lee⁸・Norwati
Muhammad⁸

1 ; 森林総合研究所、茨城県つくば市松の里 1

2 ; 筑波大学大学院生命環境研究科

3 ; 九州大学大学院理学府

4 ; 愛媛大学農学部

5 ; 京都大学生態学研究センター

6 ; サラワク森林研究センター

7 ; ゲッチンゲン大学

8 ; マレーシア森林研究所

9 ; 現所属：王子製紙森林研究所

はじめに

東南アジアのフタバガキ科は生態的及び林業的に重要な樹木である。この科は低地から丘陵地にかけて分布しており、低地フタバガキ林では森林の材積の約55%を占めるといわれている(Symington 1943)。またこの科は10属386種からなり、それぞれの種の分布域が限られているものも多い(Ashton 1982)。

この樹木は長い間それぞれの地域で活用されてきたが、一旦、商業伐採が始まると熱帯林は急速に縮小し衰退している。また違法伐採もしばしば起っている。この違法な伐採はそれぞれの国の経済的な問題なくしては解決しないが、市場に出てきた材から樹種の識別が可能なDNA鑑定システムを構築すれば、これが違法伐採を防ぐ抑止力として働くことが期待される。

そのためフタバガキ科の*Shorea*属の樹種識別のためのDNAデータベースの構築を行っている。

材料と方法

材料の収集はマレーシア森林研究所、サバ森林研究センター、ランビル及びパソの固定試験地から葉組織を収集した。また一部はインドネシアの天然林から収集している。これらのサンプルについては種同定用の標本の作成も行っている。収集した葉組織からDNAを抽出し、葉緑体DNAの4領域(*trnL* (UAA) intron、*trnL* (UAA) 3 exon - *trnF* (GAA)、*trnH*(GUG) - *trnK*(UUU)、*psbC* and *trnS*(UGA))をPCR増幅した。PCR産物を精製後、塩基配列の解読を行った。

得られた塩基配列データを用いて系統樹を近隣接合法を用いて構築した。またその際に材色での分類であるレッドメランティ、イエローメランティ、ホワイトメランティ、バラウが単系統であるかどうかの確認を行い、単系統の場合は、これらを識別する塩基サイトを調べた。また輸入する際に関税率が異なる*Shorea albida*についても他の*Shorea*属樹種と識別できる塩基を調査した。

結果と考察

葉緑体DNAの4領域である*trnL* intron、*trnL-trnF*、*trnH-trnK*、*psbC-trnS*の解読した塩基配列長はそれぞれ506 bp、441bp、1780 bp、1559 bpであった。また合計は4286bpであった。

系統解析の結果、材色での4グループは単系統であることが支持された(図-1)。それらを識別する塩基サイトはホワイトメランティ、イエローメランティ、レッドメランティ、バラウでそれぞれ9、11、6、5の塩基サイトが存在した(表-2)。

表-1 調査した*Shorea*属の種数と個体数

材色によるグループ	種数	個体数
ホワイトメランティ	8	16
イエローメランティ	10	18
バラウ	13	24
レッドメランティ	34	104
合計	65	162

表-2 *Shorea*属の材色4グループの識別塩基サイト

材色によるグループ	グループ間で異なる固定された塩基サイト	グループ内だけでの多型塩基サイト(複数起原)	グループ内だけでの多型塩基サイト(単一起原)
ホワイトメランティ	9	5	29
イエローメランティ	11	2	7
バラウ	6	6	34
レッドメランティ	5	8	48

それぞれのグループ内で同一の塩基配列を示した種も存在した。セクション*Pachycarpae*に属する*S. amplexicaulis*、*S. pinosa*、*S. splendida*、*S. stenoptera*、*S. macrophylla*は同一の塩基配列を持っていた。近縁種は同一の塩基配列を持つ場合があるが、さらに葉緑体DNAのいくつかの領域を調査して確認する必要がある。またある種が雑種起原である場合は、葉緑体DNAはまたは核DNAのITSなどの領域を調査する必要がある。

この研究ではそれぞれの種で複数サンプルを解析している場合があり、それらはマレー半島、ボルネオなど産地が異なる場合もある。いくつかの種では同一種であるが、塩基配列が異なる場合があったため、将来の地域識別の可能性を確かめるために、今後さらに同一種内のサンプル数を増やして解析する必要がある。

引用文献

- Symington, C.F. 1943 Malayan Forest Records No.16. Foresters' Manual of Dipterocarps. (Reprinted with plates and historical introduction, University of Malaya Press, Kuala Lumpur, 1974)
- Ashton, P.S. 1982 Flora Malesiana. Series I-Spermatophyta. Flowering Plants Vol.9, part 2, Dipterocarpaceae. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands.
- Tsumura Y, Kawahara T, Wickneswari R, Yoshimura K (1996) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes. Theoretical and Applied Genetics 93:22-29
- Saitou, N. and M. Nei (1987) A neighbor-joining method: a new method for constructing

phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 44: 406–425

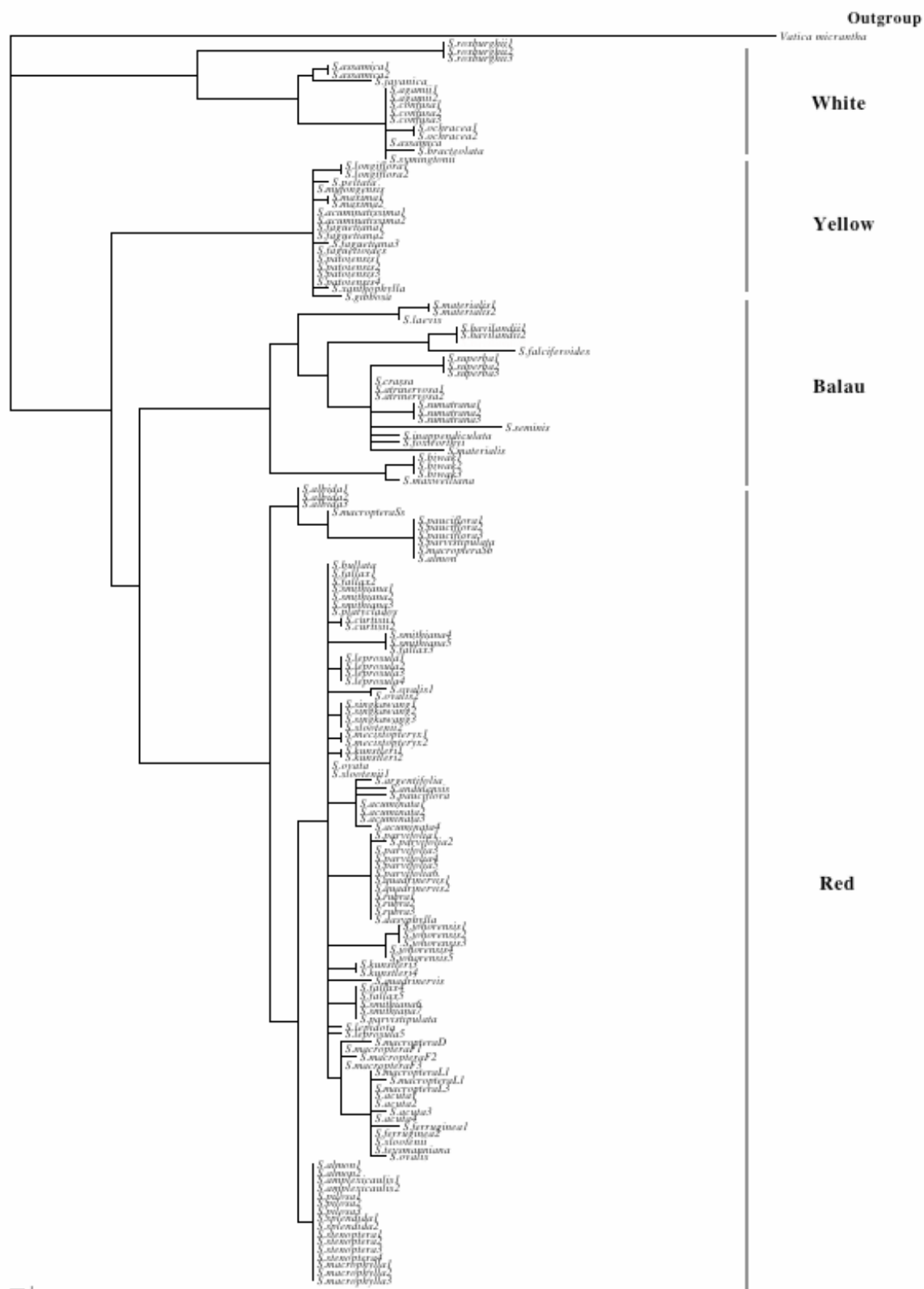


図-1 Shorea属65種162個体の葉緑体DNAの4領域の塩基配列に基づく分子系統樹

安定同位体および無機元素分析による東南アジア産材の産地識別の可能性

香川聡¹・黒田克史¹・安部久¹・藤井智之²・伊藤優子³

1) 森林総合研究所 組織材質研究室

2) 森林総合研究所多摩森林科学園

3) 森林総合研究所土壌特性研究室

akagawa@ffpri.affrc.go.jp

緒言

植物由来の農産物の産地識別技術として、安定同位体および無機元素を用いる手法はすでに一部実用化されている(藤田、2003)。例えば、ワイン、ジュース、コーヒー、茶などの飲料(Martin et al. 1988, Robards et al. 1995, Kim and Smith 2002, Weinert et al 1999)、大豆や米などの穀物(法呂ら2005、織田ら2002)やコカイン(Ehleringer 2000)等の産地識別が行われている。木材の産地識別の研究はこれまでにほとんど行われていないが、異なる産地の木材でストロンチウム同位体比が大きく異なることが報告されており(Kagawa et al 2002)、同位体分析の木材の産地識別への応用が期待できる。また、日本産樹木葉の無機元素濃度のデータベースがすでに公開されており、同一樹種で比較した場合に産地間で濃度が有意に異なる元素も存在する(高田ら 1993)。本研究ではすでに農産物の産地識別の手法として一部実用化されている安定同位体および無機元素分析の手法を違法伐採問題が最も深刻な東南アジア地域の代表的な木材(レッドメランチ)に適用し、木材の産地識別への有効性について調べた。

試料と方法

試料

以下の森林総合研究所木材標本庫所蔵のレッドメランチ標本(Shorea属Rubroshorea節)109個体を用いた:S. argentifolia (n=17), S. leprosula (n=15), S. minor (n=4), S. monticola (n=5), S. negrosensis (n=13), S. pauciflora (n=19), S. pinanga (n=5), S. platycarpa (n=5), S. quadrinervis (n=5), S. waltonii (n=4)他。これら109点の試料のうち、産地情報が分かっている102試料について、地図上で産地情報をおおよその緯度・経度に変換し、無機元素・安定同位体比が産地の緯度・経度と相関があるかの統計解析を行った。また、安定同位体比データを用いて主成分分析を行い、ボルネオ・フィリピン産のレッドメランチが異なるグループに分かれるかどうかを調べた。

安定同位体比分析

木材の安定同位体比は樹木の生育地の環境条件を反映しているが、環境条件は毎年異なる。そこで、できるだけ長期間の環境を平均した同位体比が得られるように試料は形成層から髓まで半径方向に沿って取ることが望ましい。標本の木口面から半径方向にできるだけ長い方向に、厚さ2.0mmの薄片を丸鋸で切り取った。薄片はボールミルで粒径200ミクロン以下に粉碎後、得られた木粉を酸素($\delta^{18}\text{O}$)・炭素($\delta^{13}\text{C}$)・窒素($\delta^{15}\text{N}$)同位体比測定用にそれぞれ0.1mg, 2.0mg, 10mg秤量した。これらの試料は主に森林総合研究所本所の元素分析計(CE Instruments NC2500)と質量分析計(Thermo Electron MAT252)の複合システムを用いて分析した。

無機元素分析

粉塵等によるコンタミネーションを取り除くために上記の薄片の表面をセラミックナイフで削り取った後、辺・心材部から約200mgの木片をテフロン容器に秤量し、不純物の少ない微量金属測定用の発煙硝酸を用いて湿式灰化した。灰化温度・時間はそれぞれ140℃、4時間である。灰化後、5%HNO₃溶液により原液を1100倍に希釈し、ICP発光分析(PerkinElmer Optima 4300DV)による測定溶液とした。標準試料にはNISTの植物葉(Apple leaves, Pine needles等)を用いた。測定元素は、Al, Ba, Ca, Fe, Mg, Mn, Sr, V, Znの9元素である。

結果と考察

安定同位体比・無機元素濃度と緯度・経度との相関

木材産地の緯度・経度と酸素・炭素・窒素安定同位体比との間には有意な相関が見られた一方で、無機元素濃度とは有意な相関は見られなかった(表1、図1)。1番目と2番目に高い相関を示した酸素安定同位体比と炭素同位体比を用いて2次元マップにプロットしたところ、フィリピン産とボルネオ産の木材を区別することができ、酸素同位体比が木材の産地識別に有効なことが示唆された(図2)。しかしながら、ボルネオ島内のサバ、サラワク、ブルネイ地域間の木材を区別することはできなかった。フィリピンとボルネオで酸素同位体比に差が出た原因としては、両産地間で降水の酸素同位体比(IAEA/WMO 2001)および気温・湿度が異なることが第一に考えられるが、フィリピンに生育する樹種(*S. negrosensis*)の特性である可能性もある。

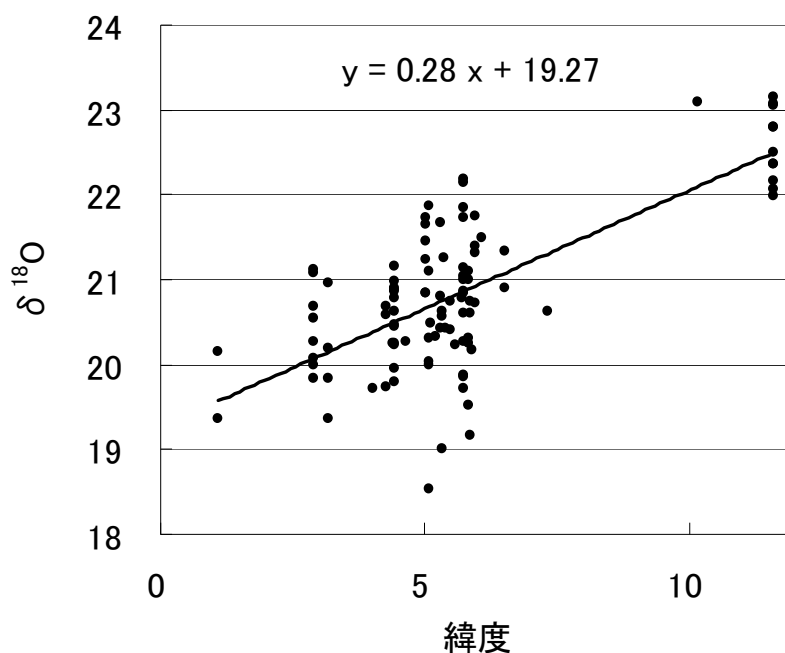


図1 木材の酸素同位体比と産地緯度(北緯)との関係

表. 1 木材の安定同位体比・無機元素濃度と産地の緯度・経度との相関

		$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	Ca	Mg	Fe	Al	Sr	V	Ba	Mn
R^2	緯度	0.51**	0.12**	0.10**	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
	経度	0.42**	0.04*	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
		** $P < 0.005$		* $P < 0.05$								

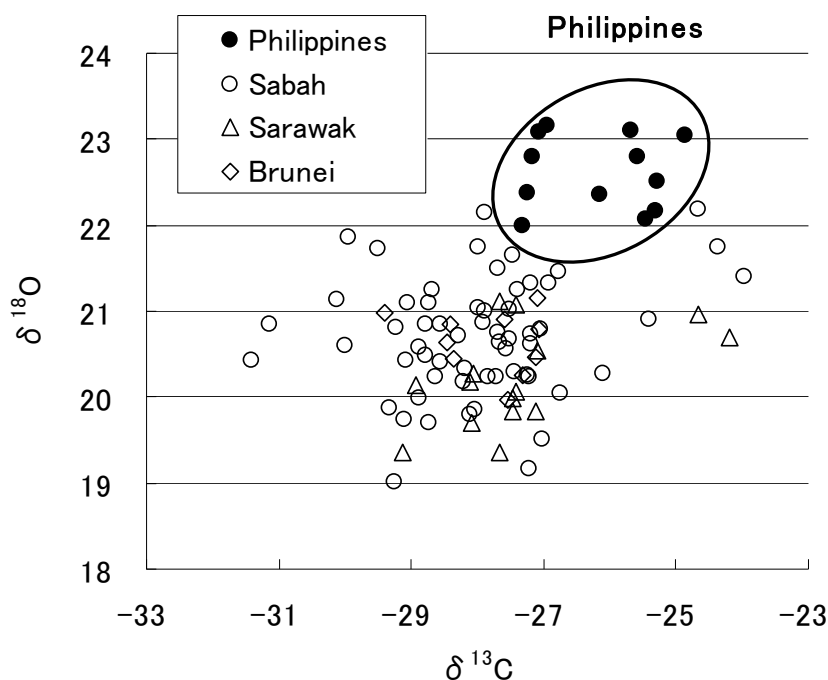


図2 酸素－炭素同位体比2次元マップによる木材の産地識別

無機元素濃度と産地の環境条件

無機元素濃度は産地の緯度・経度と有意な相関が見られなかったが(表1)、樹種間で元素濃度が有意に異なっていた。特に低いマンガン(Mn)濃度が*S. albida*, *minor*, *platycarpa*の樹種で観察され、これらの樹種は湿地林に生息するという共通点があった。アルカリ土類金属でも同様な傾向が見られ、無機元素濃度は産地の緯度・経度よりも産地の土壌・水分条件に影響される傾向が強かった。

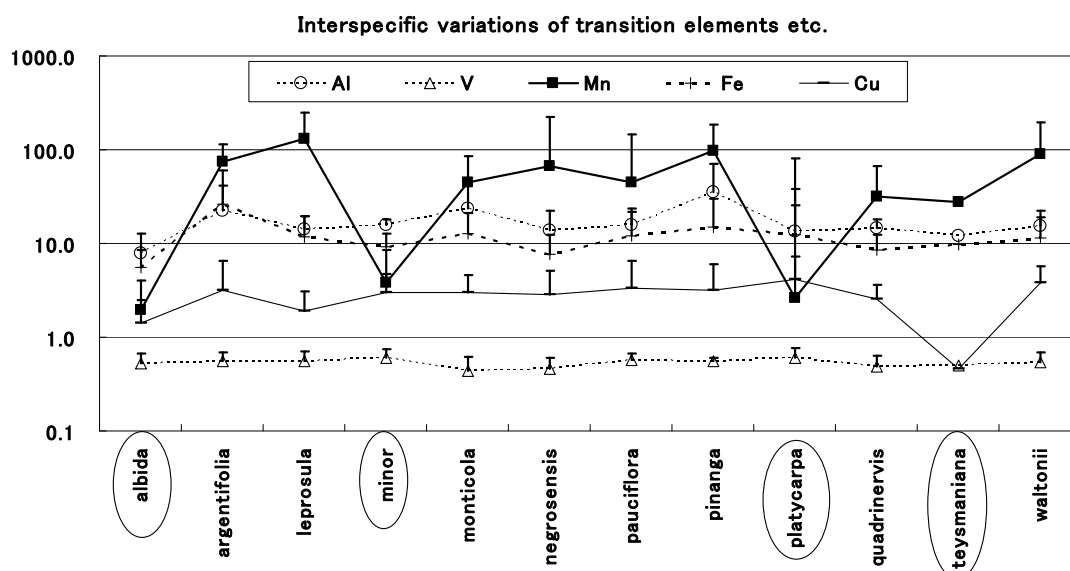


図3 木材の無機元素濃度と水分条件(丸囲部は湿地に分布する樹種)

結論

木材の安定同位体比は産地の緯度・経度と有意な相関を示し、安定同位体比が木材の産地識別に最も有効である可能性が高い。一方、一部の無機元素は産地の緯度・経度とは相関が無い代わりに、産地の土壤水分条件に影響を受けていた。同位体比により、フィリピン産とボルネオ産の木材は分離できたものの、ボルネオ島内の異なる地域の木材が分離できなかった。この原因として、熱帯材には明確な年輪が形成されないため、同一年に形成された木部同士で同位体比を比較できないという大きな問題点がある。東南アジアと並んでロシアも違法伐採問題の深刻な地域であるが、明瞭な年輪の形成されるロシア産材は安定同位体の経年変化を比較できるため、熱帯材に比べて安定同位体比を用いた産地識別のできる可能性がより高いことが予想される。

引用文献

1. 藤田哲(2003)食品のうそと真正評価 双文社印刷所
2. Martin GJ, Guillou C, Martin ML, Cabanis M, Tep Y and Aerny J (1988) Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines, *J Agric Food Chem* 36, 316-322.
3. Robards K, Antolovich M (1995) Methods for assessing the authenticity of orange juice. A review, *Analyst* 120, 1-28.
4. Kim AA, Smith BW (2002): Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee, *J Agric Food Chem*, 50, 2068-2075.
5. Weinert B, Manuela U, Mosandl A (1999) GC-IRMS analysis of Ceylon, Assam and Darjeeling teas, *Z Lebensm Unter Forsch* 208, 277-281.
6. 法邑雄司、鈴木忠直、條照雄、安井明美(2005) 日本産と中国産の黒大豆「丹波黒」における無機元素組成の差異、*日本作物学会*、74 (1)、36-40.
7. 織田久男、川崎晃(2002)微量元素の同位体比測定による米の産地国判別、*ぶんせき* 12, 678-683.
8. Ehleringer J, Casale JF, Lott MJ, Ford VL (2000) Tracing the geographical origin of cocaine, *Nature* 408, 311-312.
9. Kagawa A., Aoki T, Okada N, Katayama Y (2002) Tree-Ring strontium-90 and cesium-137 as potential indicators of radioactive pollution, *J Environ Qual* 31, 2001-2007.
10. 高田実弥、高松武次郎、佐竹研一、佐瀬裕之 (1993) 陸上植物葉の元素濃度—中性子放射化分析データ集 (I) —、国立環境研究所資料.
11. IAEA/WMO (2001) Global Network of Isotopes in Precipitation <http://isohis.iaea.org>

木材の安定同位体比分析実験法

木材の酸素安定同位体比はその起源となる根から吸収される雨水の酸素同位体比 ($\delta^{18}\text{O}$) および光合成時の気温・湿度などの環境条件を反映している(Barbour 2007)。炭素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) も同様に大気中二酸化炭素 $\delta^{13}\text{C}$ 値および光合成時の気温・湿度条件(水利用効率)を反映している(Farquhar and Richard 1984)。雨水の $\delta^{18}\text{O}$ や気候条件は時空間的(緯度経度・年)に変動するため、産地の異なる木材は異なった酸素・炭素同位体比を示し、木材の安定同位体比には緯度依存性が存在する(Epstein 1990)。木材の安定同位体比についての総説は McCarroll and Loader (2005) を参照。

木材の切り分け

気候条件の年変動のため、木材の同位体比は年々変動する。長期間の平均的な同位体比を得るためには、接線方向に2cm程度の幅で2mm程度の厚さの木口薄片を形成層から髄にかけて半径方向にできるだけ長く切り取ることが重要である。

木材の粉碎・秤量

ボールミル(Wig-L-Bug Model 30, International Crystal Laboratories, Garfield, NJ, USA)を用いて木粉を粒径200ミクロン以下に粉碎する。試料をホモジナイズ後、炭素同位体比分析用には2mg程度をスズ製のコンテナに、酸素同位体比分析用には0.2mg程度を銀製のコンテナに秤量する。秤量は精密天秤(精度 $2\mu\text{g}$ 以上、例えばMettler Toledo AX26)を用いて行う(本研究では α -セルロース抽出は行っていない)。

同位体比分析

木材の酸素・炭素同位体比分析のためには、サンプルをそれぞれ一酸化炭素、二酸化炭素にガス化し、その後同位体比計測を行う。数種類の燃焼システム(例えばCE Instruments NC2500)と質量分析計(例えばThermo Electron MAT252)が接続された自動分析装置を使って分析が行われている。これらのシステムでは一度に50サンプルがセットでき、装置の調子がよければ1日に100サンプル以上の試料を分析できる。有機物の酸素や炭素のワーキングスタンダードとしてセルロースやアラニン・チロシンが用いられている。測定精度を確認するためにスタンダードを10サンプルあたり1回程度分析する。

木材の無機元素分析実験法

木材の無機元素濃度に関する総説はCutter and Guyette (1993)を参照。

木材の切り分け

大気粉塵や金属製品による木材表面の無機元素のコンタミネーションを防ぐために、木材の切り分けはセラミックナイフで行う。安定同位体分析の場合と同様、無機元素濃度を得るために、木口薄片を形成層から髄にかけて半径方向にできるだけ長く切り取ることが重要である。

硝酸による湿式灰化法

- ・ 無機元素分析の場合、木材の粉碎の必要は無い。約 100-200mg の木材を秤量し、テフロン製の容器に入れる。
- ・ 高圧用反応分解容器(三愛科学 HU-25) にテフロン容器を入れ側溝に不純物濃度が低い有害金属測定用の発煙硝酸を 2 ml 入れる。内容物を金属製の容器に入れて締め付け器具を用いて密栓する。このときバックグラウンド測定のために、木片を入れない容器もひとつ作っておく。
- ・ これらの容器を 140 度で 4 時間加熱する。冷却するため一晩放置する。(冷めないう

ちに容器を開けると硝酸の蒸気が噴出して危険)。

- 翌日、容器を開け、1 %HN03 を合計 5 m l 用いて希釈を行う。固形物を取り除くため、プラスチックシリンジにフィルターを取り付けて、4 m l 容器にろ過液を出す。
- 希釈後、I C P 発光分析、I C P 質量分析による無機元素濃度測定を行う。

参考文献

1. Barbour M (2007) Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review, *Functional Plant Biology*, 34, 83–94.
2. Farquhar G.D. & Richards R.A. (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11, 539–552.
3. Epstein S and Krishnamurthy RV (1990) Environmental information in the isotope record in trees. *Phil Trans R Soc Lond A330*, 427-439.
4. McCarroll D and Loader NJ (2004) Stable isotopes in tree rings, *Quaternary Science Reviews* 23, 771-801.
5. Cutter BE and Guyette RP (1993) Anatomical, chemical, and eco-logical factors affecting tree species choice in dendrochemistry studies. *J Environ Qual* 22, 611–619.

樹種識別・産地特定技術の単板への応用例

藤井 智之^{1)*}・安部 久²⁾・香川 聡²⁾・加藤 厚²⁾・吉田 和正²⁾

1) 多摩森林科学園・森林総合研究所:東京都八王子市

2) 森林総合研究所:茨城県つくば市

E-mail*: tfujii@ffpri.affrc.go.jp

供試単板

今回開発した樹種識別・産地特定技術を国内の合板工場で採取した単板を試料として、応用を試みた。試料は株式会社マルヒの協力を得て、2007年3月に単板切削-合板製造の工程で採取した。この工場の用材は、主としてサバとサラワクから輸入しているレッドメランティ、ホワイトセラヤおよび、その他にパプアニューギニア(PNG)からの造林木も使われている。

生材状態の単板から試料を採取し、その一部を単板乾燥機(190～200℃)で乾燥した。また、一部の単板は、比較のために乾燥単板から試料を採取した(表 1 及び図 1)。

表 1 単板試料

試料番号	推測樹種	産地	材色	生/乾	乾燥条件
単板-1	レッドメランティ	サバ	赤褐色 灰褐色	生 乾	190—200℃
単板-2	イエローメランティ	サバ	赤褐色	乾	190—200℃
単板-3	ホワイトセラヤ	サバ		乾	190—200℃
単板-4	キャンブノスペルマ	PNG		乾	190—200℃
単板-5	レッドメランティ	サバ	赤褐色 灰褐色 灰褐色	生 生 乾	190—200℃
単板-6	レッドメランティ	サバ	赤褐色 灰褐色 赤褐色 灰褐色	生 生 乾 乾	190—200℃ 190—200℃
単板-7	レッドメランティ	サバ	灰褐色 灰褐色	生 乾	190—200℃



図 1 単板試料

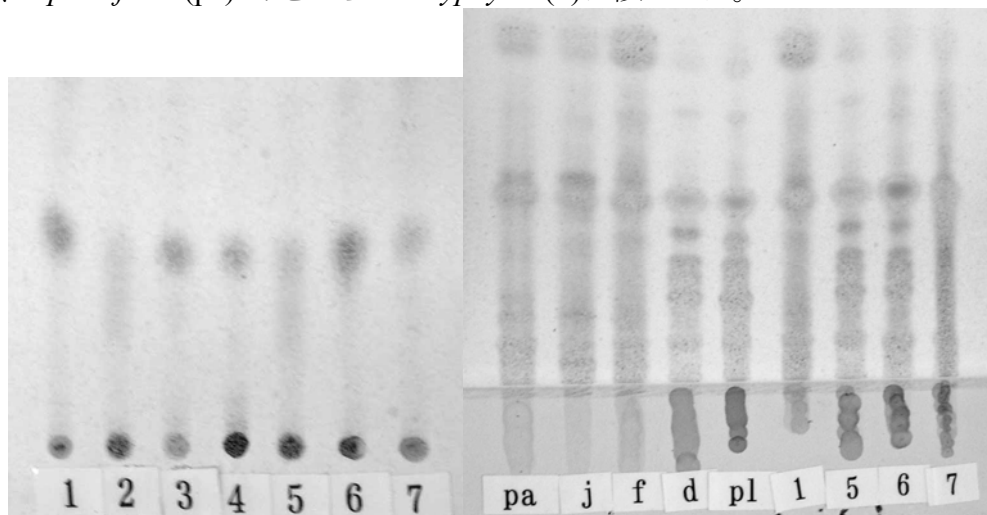
抽出成分分析

全ての単板試料からの薄層クロマト(TLC)でガリク酸が検出された(図 2)。ただし、単板-2のようにかすかに現れた試料から単板-6のように濃く現れた試料もあり、検出の程度には変異が大きかった。

単板-1、5、6および7の結果は、予想通りのレッドメランティと矛盾しない結果であった。イエローメランティとして試料採取した単板-2からも、かすかにではあるがガリク酸が検出されたが、その結果は、後述のように、木材解剖学的特徴に基づく識別結果とは一致していた。

単板-3はホワイトセラヤ(*Parashorea* spp.)として採取したので、あまり解析が進んでいないこのグループはガリク酸による解析の対象外とした。単板-4については、これまでにこの科(ウルシ科: *Anacardiaceae*)の樹木はガリク酸を一般的に多く含んでいることが知られており、キャンブノスペルマ *Camposperma* spp. (*Anacardiaceae*)にもガリク酸が検出されてもおかしくはない。

後述のDNA分析の結果から推定された樹種の木材標本と単板試料からの抽出成分をTLCパターンで比較した結果(図 3)、単板-1は *S. johorensis* (j) and *S. fallax* (f)と類似しており、木材解剖学的識別の結果と一致していた。しかし、単板-5、6、7は、木材解剖学的識別の結果とは異なり、*S. parvifolia* (pa)よりむしろ *S. dasyphylla* (d)に似ていた。



(左) 図 2 ガリク酸のTLC、1-7: 単板の試料番号

(右) 図 3 抽出成分のTLCパターン pa: *S. parvifolia*, j: *S. johorensis*, f: *S. fallax*, d: *S. dasyphylla*, pl: *S. platyclados*

木材解剖学的特徴に基づく樹種識別

単板-1、2、5、6、7は、図 4に示すように、木材解剖学的特徴によりレッドメランティ(section *Ruburoshorea* spp.)と識別された。中でも、単板-2はイエローメランティ(section *Rhicheitoides* spp.)と想定されていたが、イエローメランティに特徴的に現れる小径の水平樹脂道が無く、レッドメランティと識別された。

単板-3には、レッドメランティ(section *Ruburoshorea* spp.)とホワイトセラヤ(*Parashorea* spp.)の木材識別拠点となる鎖状の結晶があり、試料採取時の想定通りホワイトセラヤと識別された。単板-4は想定通りキャンブノスペルマ *Camposperma* sp.であった。

単板-1は軸方向柔組織にも放射柔組織にも異形細胞(idioblast)に含まれた結晶があり、かつイボ(warts)が道管壁内表面に散在していた。DNA分析の結果と合わせて樹種を絞り込むと、一致する特徴を持つ数種の中から *S. johorensis*と樹種識別された。

単板-2は軸方向柔組織にも放射柔組織にも結晶を持たず、イボがあつて繊維壁が薄い特徴があり、*S. scaberrima*、*S. waltonii*、*S. curtisii*、*S. smithiana*そして*S. ovalis*の5樹種に絞り込まれた。

単板-1、5、6、7は木材解剖学的に共通の特徴を持っており、すなわち軸方向柔組織に結晶を持つが、放射組織には結晶が無く、イボがあり、木繊維壁は薄い(図5)。従って、*S. parvifolia*、*S. smithiana*、*S. mecistopteryx*、*S. ovalis*に絞り込まれる。DNA分析の結果がある単板-6はさらに*S. parvifolia*と識別された。



図 4 単板-1の光学顕微鏡写真。左:同心円状に配列した軸方向樹脂道(木口面)。中:放射組織の異形細胞中の結晶(柁目面)。右:軸方向柔組織の異形細胞中の結晶(板目面)。

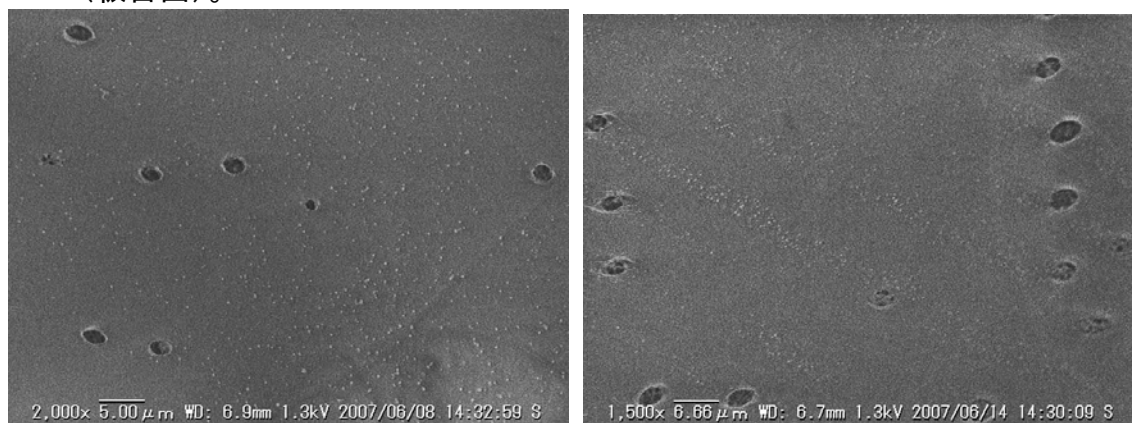


図 5 道管壁内表面の走査電子顕微鏡写真。左:単板-5、イボが散在。右:単板-6、イボがらせん肥厚状に配列。

DNA 分析

単板からのDNAの検出対象は葉緑体DNAの*trnL*イントロン、*trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) 領域、*trnH*(GUG)-*psbA*領域および*psbC*-*trnS*(UGA)領域とした。各遺伝子の検出に使用したプライマーの配列を表2に示す。ダイレクトシーケンス法により得られた塩基配列をもとに、津村らが収集した*Shorea*属樹木の葉緑体遺伝子塩基配列に基づくデータベースをBLASTNプログラムで検索し、配列が完全に一致する樹種を候補とした。

乾燥前の単板-1、5、6、7からはDNAが得られ、PCR法によって上記の葉緑体DNAの領域を増幅できた。増幅されたDNAの塩基配列をもとにデータベースを検索したところ、4つの領域全てについて塩基配列が完全に一致した樹種は表3の通りであった。

表2 PCRに用いたプライマーの配列

DNA 領域	プライマー名	DNA 塩基配列 (5'→3')
<i>trnL</i> (UAA) intron	B49317	CGAAATCGGTAGACGCTACG
	A49855	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
<i>trnL</i> (UAA)- <i>trnF</i> (GAA)	B49873	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
	A50272	ATTTGAACTGGTGACACGAG
<i>trnH</i> (GUG)- <i>psbA</i>	<i>trnH</i> (GUG)	ACTGCCTTGATCCACTTGGC
	<i>psbA</i>	CGAAGCTCCATCTACAAATGG
<i>psbC</i> - <i>trnS</i> (UGA)	<i>psbC</i> -F	GCCACCTCTCATTTTGTCTGG
	<i>trnS</i> -R	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC

表3 単板が由来した樹種のDNA分析に基づく候補

番号	生・乾/材色	含水率 (%)	木粉量 (g)	DNA 濃度 (ng/micro L)	<i>trnL</i> - <i>trnF</i> の増幅	DNA 分析による 絞り込み	総合結果
1	生	45.8	1.04	2	○	<i>S. platyclados</i> <i>S. fallax</i> <i>S. johorensis</i>	<i>S. fallax</i> or <i>S. johorensis</i>
	乾	3.3	0.92	0	×		
2	乾	6.1	1.00	?	×		
5	生/赤褐色	56.3	1.05	8	×	<i>S. parvifolia</i> <i>S. dasyphylla</i>	<i>S. parvifolia</i>
	生/灰褐色	36.5	1.10	2.5	○		
	乾	3.1	0.96	0	×		
6	生/赤褐色	53.2	1.38	18	○	<i>S. parvifolia</i> <i>S. dasyphylla</i>	<i>S. parvifolia</i>
	生/灰褐色	43.6	1.25	6	○		
	乾/赤褐色	3.6	0.94	0	×		
	乾/赤褐色	3.6	0.95	0	×?		
	乾/灰褐色	4.1	0.95	0	○		
	乾/灰褐色	4.1	0.98	0	×?		
7	生	24.3	1.10	23	○	<i>S. a parvifolia</i> <i>S. dasyphylla</i>	<i>S. parvifolia</i>
	乾	3.2	0.96	0	×		

炭素及び酸素の安定同位体比による産地の推定

レッドメランティ(*Rubroshorea* spp.)と識別された5枚の単板試料から安定同位体比を分析した結果を、ボルネオ島およびフィリピン産のレッドメランティの木材標本の炭素と酸素の安定同位体比の二次元マップにプロットした(図6)。この結果に示されているように、5点の単板(▲)は、フィリピン産のレッドメランティの範囲(◆)ではなく、ボルネオ産のレッドメランティのプロットの範囲内($\delta^{18}\text{O} = 19.0\text{‰} \sim 22.0\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C} = -29.6\text{‰} \sim -28.0\text{‰}$)にあった。このことから、酸素・炭素同位体比分析により、ボルネオ産とフィリピン産のレッドメランティを区別する可能性が示唆された。

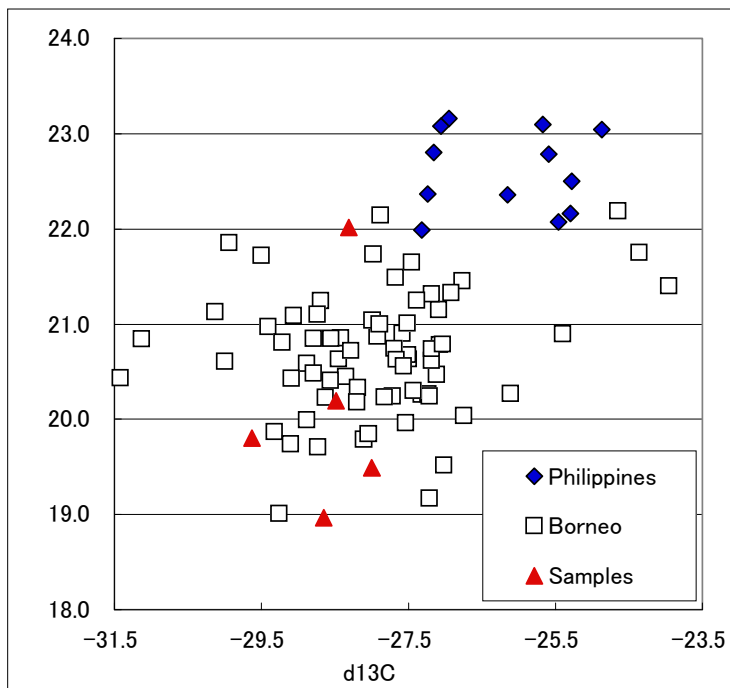


図 6 酸素と炭素の安定同位対比の二次元マップ