森林総合研究所 交付金プロジェクト研究 成果集 22

# 南洋材の樹種識別及び産地特定の 技術開発

独立行政法人 森林総合研究所 2010.3

平成4年(1992年)リオデジャネイロでの地球サミット以降、森林生態系の維持を目的とする持続可能 な森林経営が求められるようになった。東南アジアや極東ロシア、南米などでは、違法伐採および違法に 伐採された木材の市場での流通が、持続可能な森林経営への取組を著しく阻害しており、生物多様性 保全の見地からも深刻な問題となっている。21世紀に入り、違法伐採問題はサミットをはじめ、様々な国 際会議で採り上げられ、この問題に対する国際的なコンセンサスの形成と、違法伐採・貿易の取り締まり・ 排除に向けての取組みが行われるようになった。わが国では、平成17年に(社)全国木材組合連合会が 「木材表示推進協議会」を設立し、平成18年には、林野庁が「木材・木材製品の合法性、持続可能性の 証明のためのガイドライン」を策定して、合法木材の普及に努めている。木材・木製品の樹種・産地の表 示は、違法伐採対策・合法性証明のための重要なツールとして期待されているが、表示の妥当性を科学 的に検証する方法について、具体的な提案はなされていない。また、木材・木製品の関税率は樹種によ って異なっているため、通関時の樹種の虚偽申告も問題となっている。しかし、これまでの木材の識別は 目視や顕微鏡観察によることが多く、DNA 鑑定などの最新の技術を応用した例はきわめて少ない。

本研究「南洋材の樹種識別及び産地特定の技術開発」は、このような背景のもと、交付金プロジェクトと して平成15年度から19年度までの5か年にわたり、森林総合研究所が実施したものである。本研究では、 東南アジアの重要樹種であり、違法伐採の対象となることが多く、わが国でも大量に輸入しているフタバ ガキ科(Dipterocarpaceae)メランティグループ(Shorea属)を主な研究対象として、顕微鏡観察、化学分析、 DNA分析等による樹種識別および産地特定技術を開発した。平成19年9月に東南アジアの主要木材 輸出国の研究者を招いて、「東南アジア産木材の樹種識別および産地特定に関する国際シンポジウム」 を東京で開催し、本研究成果を発表したところ、国内外の関係者から高い評価とその応用への期待が寄 せられた。本成果は、違法伐採を抑止し、生物多様性の保全や合法木材の普及を推進する上で、貴重 な技術的知見を与えるものであり、ここに本書を刊行し、広く関係者の参考に供する次第である。

本プロジェクトにおいて、京都大学名誉教授伊東隆夫氏には丁寧なご指導を賜った。深く感謝の意を 表するとともに、厚くお礼申し上げる。

平成22年3月

独立行政法人 森林総合研究所理事長 鈴木 和夫

研究課題:南洋材の樹種識別及び産地特定の技術開発

目		次		
更約				1
木材組織の顕微鏡的特徴	による樹種	識別精度の高度化		9
木材抽出成分の化学分類	学的手法に	よる樹種識別技術の開	発	15
安定同位体比による木材	の産地識別			21
木材からの DNA 抽出法。	と遺伝子検	出技術の開発		31
葉緑体 DNA マーカーに。	よるカヤ属の	の樹種識別技術の開発		39
フタバガキ科 <i>Shorea</i> 属 構築	の樹種識別	のための DNA データイ	ベースの	44
	国 新 本材組織の顕微鏡的特徴 本材抽出成分の化学分類 安定同位体比による木材 本材からの DNA 抽出法 葉緑体 DNA マーカーに、 フタバガキ科 Shorea 属 構築	日 系約 木材組織の顕微鏡的特徴による樹種 木材抽出成分の化学分類学的手法に 安定同位体比による木材の産地識別 木材からの DNA 抽出法と遺伝子検 業緑体 DNA マーカーによるカヤ属の プタバガキ科 <i>Shorea</i> 属の樹種識別 構築	日 次         契約         木材組織の顕微鏡的特徴による樹種識別精度の高度化         木材抽出成分の化学分類学的手法による樹種識別技術の開発         安定同位体比による木材の産地識別         木材からの DNA 抽出法と遺伝子検出技術の開発         葉緑体 DNA マーカーによるカヤ属の樹種識別技術の開発         フタバガキ科 Shorea 属の樹種識別のための DNA データ         構築	目 次         (素約)         木材組織の顕微鏡的特徴による樹種識別精度の高度化         木材抽出成分の化学分類学的手法による樹種識別技術の開発         大材抽出成分の化学分類学的手法による樹種識別技術の開発         安定同位体比による木材の産地識別         木材からの DNA 抽出法と遺伝子検出技術の開発         葉緑体 DNA マーカーによるカヤ属の樹種識別技術の開発         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

# 研究の要約

#### I 研究年次及び予算区分

研究年次:平成15年~平成19年(5カ年) 予算区分:運営費交付金(交付金プロジェクト)

#### Ⅱ 主任研究者

主査:研究管理官(研究 COD) 田崎 清(平成15年4月1日~平成18年3月31日) 中島 清(平成19年4月1日~平成20年3月31日) 副主査: 取りまとめ責任者:バイオマス化学研究領域チーム長 加藤 厚

#### Ⅲ 研究場所

森林総合研究所、本所

#### IV 研究目的

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、生産国およ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 林破壊につながる深刻な環境問題となっている。生物多様性条約が批准されて以来、特に、東南アジア などの発展途上国では、生物資源の消失に危機感を抱いているが、有用な植物資源の違法な持ち出し は後を絶たない。このため、木材の樹種を識別し、産地を特定するシステムの構築が望まれているものの、 樹種識別は目視や顕微鏡観察によって行われており、その精度は属レベルまでの識別にとどまっている ことが多い。産地特定についても、食品分野での研究が進展してきたが、木材についてはほとんど行われ ていない。

東南アジアにおいて、フタバガキ科は生態的にも林業的にも重要であるが、その中でも Shorea 属は、 最大の種数を含む属で有用な樹種が多い。商業伐採の開始によって、急速に縮小し衰退した森林も多く、 違法伐採もしばしば起こっている。Shorea 属の木材はメランティと称され、木材流通や利用の現場におい ては、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(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つの節に相当している。メランティ 類は、わが国にも大量に輸入され、合板などとして利用されており、木材・木製品の樹種・産地の表示を 推進する上でも、この識別技術を早急に開発する必要がある。

本研究では、Shorea 属を主な対象として、樹種識別および産地特定技術を開発する。第1章から第3 章においては、木材の解剖学的特徴や化学的特徴による樹種識別および安定同位体比に基づく産地 特定を行う。第4章では隔離分布しているカヤ属を対象に、DNA塩基配列解析による樹種識別に伴い 産地識別が可能となる事例を示す。第5章および第6章では木材からのDNA分析技術を確立すると ともに、Shorea 属の DNA データベースを構築し、この技術を実際の木製品に適用して樹種識別を行う。

#### V 研究方法

#### 第1章

マレーシアサバ州、サラワク州、マレーシア半島部、フィリピンで採取し、森林総合研究所が所蔵する Shorea 属 Rubroshorea 節の木材標本 45 種 343 個体を試料とした。これらを光学顕微鏡で観察し、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。走査電 子顕微鏡(SEM)では、道管壁の修飾構造の観察を行なった。これらを識別拠点として、Rubroshorea 節の 識別を行った。

第2章

森林総合研究所木材標本庫で所蔵する木材標本の心材部の材色を色彩色差計で測色し、材色によるグループ化について検討した。フタバガキ科木材の心材成分を単離および構造決定し、心材成分の分 布表を作成した。Shorea 属 50 種について薄層クロマトグラフィー(TLC)により、ガリック酸の分布を明らか にした。ガリック酸検出のための諸条件を検討し、TLCによるレッドメランティ識別技術を開発し、合板工 場で採取した単板について、この手法を適用した。

第3章

レッドメランティ標本のうち、産地情報が明らかな試料について、地図上で産地情報をおおよその緯度・ 経度に変換し、試料の安定同位体比・無機元素が産地の緯度・経度と相関があるかの統計解析を行った。 特に安定同位対比測定においては、酸素( $\delta^{18}$ O)・炭素( $\delta^{13}$ C)・窒素( $\delta^{15}$ N)を測定した。無機元素に ついては、Al, Ba, Ca, Fe, Mg, Mn, Sr, V, Zn を測定した。また、年輪を形成するアメリカ産マツ材を用い て、炭素安定同位体を用いた同位体年輪気候学的産地同定法、"isotope dendroprovenancing"を試み、 その有効性について調べた。

第4章

由来の明確な10種の広葉樹および針葉樹を用いて、部位の違いが、DNA 抽出効率、DNA の質およ びポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction、PCR)法による遺伝子検出に及ぼす影響を解明し た。グイマツ及びミズナラの辺材薄片を用いて、熱処理の影響を解明した。国内の合板工場で収集した 合板用単板を用いて、実際の木材製品においてもDNA 分析が適用可能かどうかを検証した。

各木材試料は市販の DNA 抽出キットを利用し、手順を改変して DNA を抽出した。 DNA の濃度は蛍光 分光光度計で、 DNA の鎖長は電気泳動法で測定した。 PCR は核、葉緑体、 ミトコンドリアの遺伝子をそれ ぞれ検出できるプライマーを用意し、一般的な PCR 試薬または PCR 阻害物質の影響を緩和する試薬を 用いて実施した。 PCR で増幅された DNA は、塩基配列を決定した後、 DNA データベースを検索し、遺伝 子が由来した生物種を確認した。

第5章

カヤ属は世界で7種あり、その天然分布は日本、中国、北米に限られている。これらの葉サンプルを収 集し、改変 CTAB 法または DNeasy Plant Mini Kit により DNA 抽出を行った。葉緑体 DNA 上の8カ所の 領域(総塩基約 5200 ベース)を対象として、主要な種について塩基配列解析を行って、種識別に有効な 領域を探索した。その後、絞り込んだ数カ所の領域について、全ての樹種サンプルの塩基配列を確定し、 各樹種の識別を試みた。

第6章

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などから、Shorea 属

 $\mathbf{2}$ 

の葉組織 85種、202個体を収集した。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。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った。これら4つの材色の分類がそれぞれ単系統である場合は、これらを識別する塩基サイトを調べた。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。

VI 研究結果

研究計画表

構成課題名	H15	H16	H17	H18	H19
木材組織の顕微鏡的特徴による樹種識別制度の高度化(第1章)	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$
化学分類学的手法による樹種識別技術の開発(第2章)	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$
無機元素・同位体分析による木材の産地特定手法の開発(第3章)	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$
木材からの核酸単離法の開発と材質を支配する遺伝子の機能解明(第4章)	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$
葉緑体 DNA マーカーによるカヤ属の樹種識別(第5章)	$\bigcirc$	$\bigcirc$	$\bigcirc$		
DNA マーカーによる Shorea spp.の個体識別技術の開発(第6章)	0	$\bigcirc$	0	0	0

第1章

Rubroshorea 節の木材標本を光学顕微鏡により観察し、結晶については、結晶が存在しないもの、結晶が軸方向柔細胞にのみ存在するもの、結晶が軸方向柔細胞と放射柔細胞に存在するもの、樹種の特徴が見られないものに分類した。木部繊維の細胞壁については、厚壁のもの、薄壁のもの、厚壁の部分と薄壁の部分が両方存在するものに分類した。電子顕微鏡(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。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。

すでに報告されている水平樹脂道の有無についての報告と、今回の研究で得られた、結晶の分布様式、木部繊維の壁厚、道管壁の修飾構造についてまとめ、*Shorea* 属 *Rubroshorea* 節木材の樹種識別のための識別表を作成した。この識別表によって種レベルでの特定はできないが、*Shorea* 属 *Rubroshorea* 節の木材を16のグループに分類することができた。

第2章

心材色にはある程度のグループ毎の分布の差は認められたが、材色だけでレッドメランティを完全に識別することは困難であった。

Shorea 属を中心とするフタバガキ科の心材から、新規物質を含む多種多様なレスベラトロールオリゴマ ー類およびガリック酸などの加水分解タンニン類を単離した。Shorea 属においては shorealactone が広く 分布していた。分布表では、多くの成分が重複して存在するため、一般に種レベルでの識別は困難であ った。しかし、S.almon からは shorealactone などのレスベラトロール類そのものは単離されず、単離された ものはすべて C-配糖体となっており、一部の種では種レベルでの識別も可能と思われる。

TLC を用いて Shorea 属におけるガリック酸の分布につい検討した結果、レッドメランティには存在して

いたが、他のグループでは存在を確認できなかった。そこで、ガリック酸を指標成分とする TLC によるレッドメランティの識別技術を開発した。レッドメランティと確認された合板用単板からも、微量のガリック酸が検出されたことから、簡易識別法として実用可能であることが実証した。

#### 第3章

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。調べた分 析パラメータのうち、1番目と2番目に緯度・経度との間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、 特に酸素同位体比が Shorea 材の産地識別に有効なことが示唆された。しかしながら、ボルネオ島内の異 なる地域(サバ、サラワク、ブルネイ)の木材を区別することはできなかった。

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、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。

同位体年輪気候学的手法による木材の産地同定について検討した結果、熱帯材では明瞭な年輪が 形成されないために、長期間の平均値一点での比較になり、産地識別の空間精度が1000km以上と低か った。しかしながら、四季の明瞭な温帯 – 冷帯材では年輪が形成されるために安定同位体比の時系列を 作ることが可能であり、空間識別精度は100-300kmであった。

#### 第4章

木材や木材製品の樹種識別に DNA 分析技術を適用するため、市販の DNA 抽出キットを用いて分析 に使用可能な量と質の DNA を木材から得られるように操作手順を改変した。

木部の放射方向の部位の違いについて検討した結果、辺材や、辺心材の区別が不明瞭な樹種の外 側の木部からの DNA 抽出効率は高い場合が多かったが、心材や内側の木部では低かった。抽出された DNA の鎖長は主に 250 塩基対から 2,000 塩基対の範囲にあり低分子化していた。これらの多くの DNA から PCR 法によって葉緑体遺伝子(*rbcL*)、ミトコンドリア遺伝子(*cox1*)および核遺伝子(*rDNA*)が増幅で きた。遺伝子が増幅できない木材の DNA については PCR 阻害物質の共存が推定された。

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。従来の試薬ではDNAを 増幅することができなかった上記の心材や辺材、180℃で熱処理したグイマツ辺材のDNAから、PCR阻害 物質の影響を緩和するPCR試薬を用いると葉緑体遺伝子を検出できた。

開発した DNA 抽出法と遺伝子検出法を合板用単板の樹種識別に応用し、この手法が木材の DNA 分析に広く適用できることを実証した。

第5章

DNA 塩基配列解析による樹種識別に伴い産地識別が可能となる事例を示すことを目的に、カヤ属の 葉緑体 DNA の塩基配列比較による樹種識別法の開発を行った。葉緑体 DNA 上の8 領域の塩基配列を 比較したが、その結果、世界の7種のカヤ属樹種(中国4種、日本1種、北米2種)について、rbcL、 trnL-trnF、trnR-trnN のいずれかの塩基配列の比較により、各樹種が明確に識別できることが明らかとな った。

当初予期しなかった成果として、従来はカヤの変種と考えられてきたチャボガヤが、カヤと大きく異なる 種であり、むしろ中国産の T. grandis に近い種と推定されることが明らかとなった。

## 第6章

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。また合計の塩基配列長はギャップを含んで 4286bp であった。種を識別する多型サイトはイエローメランティの 17 サイトからレッドメランティの 128 サイトの範囲 で塩基配列が長くなるほど多型サイトが多くなる傾向があった。各材色グループ内での塩基多様度はホワ イトメランティで最も高く、イエローメランティが最も低かった。系統解析の結果、材色での 4 グループは *S.* roxburghiiを除いて単系統であることが支持された。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。それぞれのグル ープ内で同一の塩基配列を示した種、また、異なるセクションに属する種が同一の塩基配列をもつものも 存在した。

#### VII 成果の利活用

本研究で用いた手法の内、顕微鏡観察はこれまで最も一般的に行われてきた識別手法であるが、本 研究の結果を基に、識別拠点を加えて精度を高め、レッドメランティの節以下の識別表を作成し、16のグ ループに分類できることを明らかにした。化学分析による識別については、ガリック酸を指標としてレッドメ ランティの識別が可能であることが見出された。これは精度は劣るものの、簡易な手法であり、顕微鏡観察 等の他の識別手法を補完することができるものと思われる。これらの知見は森林総合研究所で行っている 樹種鑑定業務に活用するとともに、関税中央分析研究所を通し、通関の現場での普及に努めている。

無機元素や同位体分析による木材の産地特定については、実用レベルの精度には至らなかったもの の、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有意な相関が見出されており、安 定同位体比分析技術の改良により、精度の向上と実用化が期待される。

DNA分析は精度の高い手法であるが、木材からのDNA抽出が困難であり基本となるデータがそろっていないため、ほとんど用いられていなかった。本研究でのDNA抽出および遺伝子検出の改良と Shorea 属のDNA データベースの構築により、DNA による木材の樹種識別が一般化し、違法伐採や輸入に係る違法申告を減少させる抑止力として有効に機能するものと思われる。特に Shorea 属のDNA データは、ウェブ上で公開し種識別のデータベースとして活用できるようにする予定である。

カヤ属の DNA による識別については、違法伐採対策という本研究の直接の目的からそれるものの、文 化財の識別においてはきわめて重要であり、関連分野において活用されるものと思われる。

#### 

本研究は樹種識別と産地特定のための技術開発を目的にしたものであるが、産地特定については、 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有意な相関が見られたものの、実用的 な手法として確立するまでには至らなかった。これは、熱帯材では明瞭な年輪が形成されないため、長期 間の平均値一点での比較になり識別精度が低いためであるが、*Shorea*などの年輪を形成しない樹種でも、 目に見えない安定同位体比の年輪が存在することが報告されており、熱帯産材でも産地特定が行えるよ うに、安定同位体比分析技術を改良していく必要がある。

DNA 分析による樹種識別については、基本となる手法が確立され、実際に識別可能であることが実証 された。しかし、高温で乾燥された単板からは DNA を抽出できず、最終製品である合板の DNA 分析に必 要な遺伝子の検出法を見出すことができなかった。合板などの木材製品の樹種識別を行うためには、熱 処理や接着剤・塗料が遺伝子検出に与える影響を解明し、遺伝子検出技術をさらに改良する必要がある。

本研究ではフタバガキ科の Shorea 属を主な対象としたが、属間や科間を統一的に比較する場合には、 さらに多くの DNA 領域の情報が必須であり、いくつかの共通領域を多くの樹種について比較できる情報 を完備しようとする、いわゆる DNA バーコーディング情報の整備が必要である。

これらの問題については、20 年度より開始される交付金プロジェクト「合法性・持続可能性木材の証明 のための樹種・産地特定技術の開発」において研究を行う。

#### IX 研究発表

- 柴田正志,甲田政則,伊東聡美,熊野勉,安部久(2003)材色の相違を利用した熱帯産木材の 識別に関する検討,関税中央分析所報,43,43-49.
- 2. 伊藤聡美,柴田正志,熊澤勉,安部久,藤井智之,緒方健(2004)輸入合板の表面単板(表板, 裏板)におけるレッドメランチ材の使用割合,木材工業,**59**(5),217-220.
- 安部久,伊藤聡美,柴田正志,藤井智之,緒方健(2004)東南アジアから日本に輸入されている 木材樹種の変化,第54回日本木材学会大会研究発表要旨集,10.
- Abe, H., Itoh, S., Shibata, M., Ogata, K., Kitin, P. and Fujii, T. (2005) Tree species of timber imported to Japan from southeast asia, JIRCAS Working Report, 39, 251-253.
- Kitin, P., Abe, H. and Fujii, T. (2005) Characterization of wood structure by confocal microscopy and SEM. JIRCAS Working Report, 39, 285-287.
- Nishimura, S., Yoneda, T., Fujii, S., Mukhtar, E., Abe, H., Kubota, D., Tamin, R. and Watanabe, H. (2006) Altitudinal zonation of vegetation in the Padang region, West Sumatra, Indonesia, TROPICS, 15(2), 137-152.
- Nishimura, S., Yoneda, T., Fujii, S., Mukhtar, E., Abe, H. and Kanzaki, M. (2006) Factors influencing the floristic composition of a hill forest in West Sumatra, TROPICS, 15(2), 165-175.
- 8. 安部久 (2006) 東南アジアにおける木材生産の現状と用材生産のための研究の重要性,第 55 回 生存圏シンポジウム「森林資源の持続的利用を支えるバイオサイエンス」ロ演集,5-7.
- 9. Zhang, C., Sano, Y., Abe, H. and Fujiwara, T. (2006) Variation in the structure of interfibre put pairs, Proceeding of the 5th Plant Biomechanics, Salmen L. (ed.), STFI Packforsk AB, 383-386.
- 安部久,藤井智之 (2007) Shorea 属 Rubroshorea 節 (Dipterocarpaceae: フタバガキ科)の木材の顕 微鏡による識別拠点,第 57 回日本木材学会大会研究発表要旨集,6.
- Abe, H. and Fujii, T. (2007) Anatomical identification of wood of section *Rubroshorea* species. Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify Shorea species wood and its origin, Forestry and Forest Products Research Institute, 23-26.
- 12. Fujii, T., Abe, H., Kagawa, A., Kato, A and Yoshida, K. (2007) Trial identification of tree species and its origin of commercial veneer, Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify Shorea species wood and its origin, Forestry and Forest Products Research Institute, 45-49.
- Ogata, K., Fujii, T., Abe, H. and Baas P. (2008) Identification of timbers of Southeast Asia and western pacific, Kaiseisha Press. 400p.

- 加藤厚,菱山正二郎 (2005) Shorea 属心材成分によるケモタクソノミーI TLC による分離,第55 回日本木材学会大会研究発表要旨集,212.
- 加藤厚, 菱山正二郎 (2005) Shorea 属心材成分によるケモタクソノミーII S.negrosensis, S.albida, S.hypochra の心材成分, 第 55 回日本木材学会大会研究発表要旨集, 212.
- Kato A, and Hishiyama S. (2005) Chemotaxonomy of *Shorea* based on the heartwood extractives, International Symposium on Wood Science and Technology, 2, 307-308.
- 17. 加藤厚, 菱山正二郎 (2006) *Shorea pauciflora* の心材成分, 第 56 回日本木材学会大会研究発表 要旨集, 120.
- 加藤厚,菱山正二郎 (2006) Shorea pauciflora のレスベラトロールオリゴマー類およびその配糖体, 第 127 回日本薬学会大会研究発表要旨集,135.
- 19. 加藤厚, 菱山正二郎 (2007) *Hopea pierrei*の心材成分, 第 57 回日本木材学会大会研究発表要旨 集, 141.
- 20. Kato, A and, Hishiyama, S. (2007) Identification of red meranti based on the heartwood extractives, Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify *Shorea* species wood and its origin, Forestry and Forest Products Research Institute, 20-22.
- 加藤厚,菱山正二郎 (2008) Shorea almon から単離した新規 resveratrol oligomer 配糖体の構造, 第 58 回日本木材学会大会研究発表要旨集, 141.
- 22. Kagawa, A., Kuroda K., Abe H., Fujii T. and Itoh Y. (2007) Stable isotopes and inorganic elements as potential indicators of geographic origin of southeast Asian timber. Proceedings of the International symposium on development of improved methods to identify *Shorea* species wood and its origin, Forestry and Forest Products Research Institute, 39-44.
- 23. Kagawa, A., Abe H., Fujii T., Kato A., Tsumura Y. and Yoshida K. (2007) Chemical fingerprints and DNA marker as potential indicators of geographical origin and tree species of tropical timber, Workshop by German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection on "Fingerprinting methods for the identification of timber origins", 2.
- 24. 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,5,289-298.
- 25. 吉田和正, 香川聡, 伊ヶ崎知弘, 西口満, 向井譲 (2006) 木材の部位、保存期間および熱処理が 木材からの DNA 抽出効率と遺伝子検出に与える影響. 第 56 回日本木材学会大会研究発表要旨 集, 95.
- 吉田和正,西口満(2007)木材の樹種識別のための DNA の増幅に有効な PCR 試薬の検討,第 57回日本木材学会大会研究発表要旨集,87.
- Yoshida, K., Kagawa, A., Nishiguchi, M. (2007) Extraction and detection of DNA from wood for species identification, Proceedings of the International symposium on development of improved methods to identify *Shorea* species wood and its origin, Forestry and Forest Products Research Institute, 27-34.
- 28. 吉田和正, 安部久, 加藤厚, 津村義彦, 藤井智之(2008) 組織観察・抽出成分分析・DNA 分析に よる合板用単板の樹種推定, 第58回日本木材学会大会研究発表要旨集, 94.
- 29. Nanami, S., Ikeda S., Tani, N., Tan, S., Diway, B., Harada, K., Tsumura, Y., Itoh, A. and Yamakura

T. (2007) Development of microsatellite markers for Dryobalanops aromatica (Dipterocarpaceae), a tropical emergent tree in Southeast Asia. Molecular Ecology Notes **7**, 623-625

- Lee, S. L., Tani, N., Ng, K. K. S. and Tsumura Y. (2004) Characterization of 15 polymorphic microsatellite loci in an endangered tropical tree Hopea bilitonensis (Dipterocarpaceae) in Peninsular Malaysia Molecular Ecology Note, 4, 147-149.
- Lee, S. L., Tani, N., Ng, K. K. S. and Tsumura Y. (2004) Isolation and characterization of 20 microsatellite loci for an important tropical tree *Shorea* leprosula (Dipterocarpaceae) and their applicability to S. parvifolia, Molecular Ecology Note 4, 222-225
- 32. Tsumura, Y., Ujino-Ihara, T., Obayashi, K., Konuma, A. and Nagamitsu, T. (2003) Mating system and gene flow of Dipterocarps revealed by genetic markers. Pasoh -Ecology of a Lowland Rain Forest in Southeaset Asia, pp.285-292. Springer-Verlag, Tokyo.
- Kajita, T. and Tsumura Y. (2003) Molecular phylogeny of Dipterocarpaseae. Pasoh -Ecology of a Lowland Rain Forest in Southeaset Asia, pp.261-272. Springer-Verlag, Tokyo.
- 34. Tsumura, Y., Kado, T., Taguchi, Y., Fukue, Y., Tani, N, Yoshimura, K., Kamiya, K., Harada, K., Takeuchi, Y., Diway, B., Finkeldy, R., Lee, S. L. and Muhammad, N. (2007) Molecular database for species classification of *Shorea* species, Proceedings of the International symposium on development of improved methods to identify *Shorea* species wood and its origin, 35–38.

# X 研究担当者

第1章 安部久(組織材質研究室) 第2章 加藤厚(バイオマス化学研究領域チーム長)、菱山正二郎(抽出成分研究室) 第3章 香川聡(組織材質研究室)、安部久(組織材質研究室)、藤井智之(関西支所長)、伊藤優子(土壌特性 研究室) 第4章 吉田和正(生物工学研究領域) 第5章 吉丸博志(森林遺伝研究領域長)、能城修一(木材特性研究領域チーム長) 第6章 津村義彦(樹木遺伝研究室長)、谷尚樹、上野真義(樹木遺伝研究室)

# 第1章 木材組織の顕微鏡的特徴による樹種識別精度の高度化

#### ア 研究目的

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(地球・人間環境フォーラム, 2008)。 また、木材の輸入関税を安くするため、樹種を偽って輸入している例も報告されている(伊藤ら, 2004)。こ のような背景の基に、木材や木製品を利用する消費者も商品に関する表示に対する関心が高まり、その 要望に応えて、生産者による品質、材質表示の適正化の自主的な取り組みも行われる様になってきた (角谷ら, 2007)。それに伴って森林総合研究所に木材の樹種の識別を依頼される件数も増加傾向にあり、 それらの3分の1は東南アジア産の木材が占めている。東南アジアから日本に輸入される木材の7割以 上は東南アジアの森林において、優先的に生育しているフタバガキ科の樹木の木材であり、それらの多く は合板として利用されている(伊藤ら, 2004; Abe *et al*, 2005; Abe *et al*, 2007)。そのため、フタバガキ科 樹木の木材の識別技術を向上させることは、東南アジアから輸入される木材の樹種表示の真偽を科学的 に証明することにつながる。

現在、科学的に木材を識別する場合は、一般に目視や、顕微鏡用いて木材を構成する細胞の分布や 配列等を基準にして樹種の決定がなされており、その精度は植物学的な属レベルまでの識別にとどまっ ている。しかし、同一の属内に分類されている樹種でも、実際の植物学的関係が遠い場合は、識別が可 能になる場合がある。例えば、フタバガキ科樹木の中でも最も流通量の多い Shorea 属は、Rubroshorea節、 Shorea 節、Richetioides 節、Anthoshorea 節に分けることができるが、木材の解剖学的な特徴の違いによ って、それぞれの節の木材まで識別することができる。Shorea 属の中でも最も流通量の多い通称レッドメラ ンティと呼ばれている Rubroshorea 節の木材は、結晶の存在形態によって識別することが可能であるが、 樹種や個体によっては結晶を有していないこともある(Desch, 1941; Burgess, 1966; Gottwald *et al*, 1966; Ogata *et al*, 2008)。

本研究では、東南アジア産材で最も多く使われている Shorea 属 Rubroshorea 節の木材の樹種、採集 地明確な標本を用いて、顕微鏡的に解剖学的な特徴を精査して、木材の解剖学的な特徴によって節以 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。

#### イ 研究方法

#### 1. 試料

森林総合研究所が所蔵するフタバガキ科(Dipterocarpaceae)*Shorea*属*Rubroshorea*節の木材標本 45 種 343 個体の標本を用いた。標本の採取地は主にマレーシアサバ州、フィリピン、マレーシア半島部、サラワク州であった。

# 2. 光学顕微鏡観察

木材標本から、木口、柾目、板目の3断面の切片を作製し、サフラニンーゲンチアンバイオレットで染色後、エタノールシリーズで脱水し、カナダバルサム樹脂で封入し、永久プレパラートを作成した。それらを 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。

#### 3. 走査電子顕微鏡観察

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、柾目面が観察可能な

厚切片(L:10×R:10×T:3mm)を切り出し、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いた後、充分に水洗し、エタノールシリーズで脱水後、風乾した。試料は アルミニウム製の試料台に固定後、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)で観察した。主に、道管壁の修飾構造の観察を行った。

#### ウ 結果

#### 1. 光学顕微鏡による観察

観察対象の 343 個体の内、235 個体で結晶が見られた(表 1-1)、軸方向柔細胞ではその内で放射柔 細胞に結晶が存在する標本は 133 個体であった(図 1-2)(表 1-1)。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 晶を有していなかった(表 1-1)。結晶はすべてが異形細胞中に存在していた(図 1-1, 2)。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。木部繊維 の細胞壁については、厚壁のもの(図 1-3)、薄壁のもの(図 1-4)、厚壁の部分と薄壁の部分が両方存在 するものに分けられた(表 1-1)。

#### 2. 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。フタバガキ科の樹木は、通常ベスチャード壁孔を有するが、(図 1-5)イボとベスチャーが類似しているため、ベスチャードと連続していない部分のイボをイボ状層として存在の有無を観察した(図 1-6)。19 種で道管壁にイポが認められ、21 種でイボが認められなかった(表 1-1)。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(図 1-7)。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 1-8)。

#### エ 考察

今回、検討した識別指標については、同一種で一定の傾向を示す樹種と、個体ごとにばらつきのある 樹種があった。これらがばらつく要因については、生育値の状態や地理的な要因等が考えられる。結晶 の有無についての地理的・環境的要因については明確にされていない。細胞壁厚のばらつきについては、 雨季、乾季のある熱帯では細胞壁厚が厚くなるという報告もあり、生育環境によるものと考えられる(早川 ら, 2006)。

すでに報告されている水平樹脂道の有無についての報告(Desch, 1941; Burgess, 1966; Gottwald et al., 1966; Ogata et al., 2008)と、今回の研究で得られた、結晶の分布様式、木部繊維の壁厚、道管壁の修飾構造についてまとめ、Shorea 属 Rubroshorea 節木材の樹種識別のための識別表を作成した(表 1-2)。この識別表によって種を確定することはできないが、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になるものと考えられる。



図 1-5 イボ状層とベスチャード壁孔 図 1-6 ベスチャード壁孔 図 1-7 らせん状に分布したイボ状層 図 1-8 らせん肥厚上にイボ状層が堆積

# 表 1-1 Shorea 属 Rubroshorea 節木材の識別拠点の観察結果

数字は観察された標本数、+は有り、-は無し、\*は標本によって異なる

種名	個体 数	結晶存在	放射柔細 胞に結晶	木繊維壁厚	イボ	色	水平樹脂 道
albida	5	1	0	thick	+	dark	
almon	16	15	12	thin	+	light	
amplexicaulis	3	3	1	thin	-	light	
andulensis	1	1	0	thick	+	dark	
argentifolia	14	10	3	thin	-	light	
balangeran	1	1	0	thick		dark(heavy)	
beccar i ana	6	1	1	thin	-	light	
bullata	2	0	0	thick	+	dark	
curtisii	2	0	0	thin	+	dark	
dasyphylla	3	2	0	thick	-	light(heavy)	
fallax	17	12	12	thin-thick	*	light	
ferruginea	2	2	0	m	-	light	
flaviflora	1	1	0	thick	+		
inaequilatera	3	3	0	thick	+	dark(heavy)	
joholensis	16	16	16	thin	+	light	
kunstleri	2	2	2	thick	+	dark(heavy)	
leprosula	18	13	10	thin	+	light	у
macrophylla	19	19	18	thin	+	light	
macroptera	14	9	1	thin	-	light	
mecistoptery>	9	7	0	thin	*	light	
minor	6	4	4	thick	+		
monticola	5	0	0	thick	+	dark	
myrionelva	1	1	1	thin	-	dark	
negrosensis	9	1	0	thin	-	dark	
ovalis	11	5	3	thin	*	light	
ovata	5	3	0	thin-thick	*	light	у
palembanica	2	2	2	thin	+	light-dark	
palosapis	4	0	0	thin	-	light	
parvifolia	33	24	2	thin	+	light	
parvistipulat	8	7	7	thin-thick	*	light	
pauciflora	24	21	19	thin-thick	-	dark	
pilosa	5	4	0	thin	-		
pinanga	8	6	6	thin	-	light	
platycarpa	5	4	2	thin	-	light-dark	
platyclados	2	1	0	thick	+	dark	
polysperma	10	3	0	thin	-	dark	
quadrinervis	5	1	0	thin	-	light	
rubella	4	1	0	thin	-	dark	
rubra	1	1	1	thin		dark	
rugosa	1	1	1	thin	-	dark	
scaberrima	3	0	0	thin	+	light	
scabrida	7	5	4	thin	-	light	
selanica	1	1	0			dark	
smithiana	12	7	1	thin	+	light	
teysmaniana	2	2	0	thin	-	light	у
uliginosa	4	4	4	thick	-	dark	
venulosa	8	8	0	thick	-	dark(heavy)	
waltonii	3	0	0	lthin	+	light	I

# 表 1-2 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				
Α	ovata	0	×	Δ	thin-thick
	teysmaniana	0	×	×	thin
	leprosula	0	0	OS	thin
水平	樹脂道を持たない樹種				
В	kunstleri	0	0	0	thick
	minor	0	0	0	thick
	fallax	0	0	$\bigtriangleup$	thin-thick
	parvistipulata	0	0	$\bigtriangleup$	thin-thick
	andulensis	$\triangle$	Δ	0	thick
C	ovalis	$\triangle$	$\triangle$	$\bigtriangleup$	thin
	fallax	0	0	$\triangle$	thin-thick
	parvistipulata	0	0	$\triangle$	thin-thick
	macrophylla	0	0	OS	thin
	almon	0	0	0	thin
	joholensis	0	0	0	thin
	palembanica	0	0	0	thin
	uliginosa	0	0	×	thick
	paucifiora	0	0	~	thin-thick
	paucinora	0	0	×	thin thick
	scabrida	0	0	×	thin
	nlatvcarna	0	^	x	thin
	amplexicaulis	$\triangle$	$\Delta$	x	thin
F	nlatyclados	<u> </u>	 ×	OS	thick
	inaequilateralis	0	×	0	thick
	andulensis	<u> </u>	<u>^</u>	0	thick
G	narvifolia	0	×	05	thin
Ŭ	smithiana	~	×	0	thin
	mecistontervy	0	×	~	thin
	ovalis	^	^	^	thin
Н	dasynbylla		×	<u>×</u>	thick
''	vopuloco	0	×	$\hat{\mathbf{v}}$	thick
	formuringe	0	×	$\hat{\mathbf{v}}$	thin-thick
	ferruginea	0	×	<u>~</u>	thin-thick
1'	rerruginea	<u> </u>	^	~	thin-thick
	ovalis				thin
	argentifolia	0	×	*	thin
	macroptera	0	×	×	thin
	pilosa	0	×	×	thin
<u> </u>	polysperma		×	×	thin
J	andulensis	$\bigtriangleup$	$\Delta$	0	thick
	bullata	×	×	0	thick
	platyclados	$\bigtriangleup$	×	OS	thick
	albida	×	×	OS	thick
	monticola	×	×	OS	thick
K	smithiana	$\bigtriangleup$	×	0	thin
	curtisii	×	×	0	thin
	scaberrima	×	×	0	thin
	waltonii	×	×	OS	thin
	ovalis		Δ	Δ	thin
L	ovalis		Δ	Δ	thin
1	polysperma	$\Delta$	×	×	thin
1	negrosensis	×	×	×	thin
	beccariana	×	×	×	thin
	palosapis	×	×	×	thin
	quadrinervis	×	×	×	thin
1	rubella	×	×	×	thin

#### オ 今後の問題点

樹種については、解剖学的特徴のみからでは断定できないことが分かった。DNA 分析や化学的な手法と組み合わせて、行うことが実効性のある識別方法であり、さらに精度を上げていく必要がある。

レッドメランティ(Shorea 属 Rubroshorea 節)には 68 種があるといわれている(Ashton, 1982)。今回は 45 種の標本を収集するのにとどまった。しかし、それらのほとんどは、日本が多くの南洋材を輸入しているボルネオ島の標本であり、日本に輸入されているレッドメランティの識別には対応できる。また、マレー半島 産のレッドメランティや隔離分布している希少種に関しては、今後、関係機関と協力して標本を収集していく。

#### カ 要約

フタバガキ科 Shorea 属 Rubroshorea 節木材の樹種識別の精度を向上させるため、45種 343の木材標本について、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて識別拠点の探索を行った。その結果、細胞内の結晶、細胞壁厚、イボ状層の有無などが識別拠点として節以下の識別に用いられることが分かった。

## キ 引用文献

- Abe, H., Itoh S., Shibata, M., Ogata, K., Kitin, P., and Fujii, T. (2005) Tree species of timber imported to Japan from southeast asia, JIRCAS Working Report, **39**: 251-253.
- Abe, H. (2007) Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify Shorea species wood and its origin, Forestry and Forest Products Research Institute, 1-2.

Ashton, P.S. (1982) Flora Malesiana, 9(2), 237-552.

Burgess, P.F. (1966) Timber of Sabah, Forestry department of Sabah, Sabah, Malaysia, 1-501.

Desch, H.E. (1941) Malayan Forest Records, 14, 1-171.

- Gottwald, H. and Parameswaran, N. (1966) Botanische Jahrbücher, 85(3), 410-508.
- 早川雅納,吉武広樹,安部久,藤原健,加茂晧一,James,J.,Zamrie,I.,Vacharanghura,T., Tiyanon. S., Viriyabuncha, C., 久保隆文、船田良(2006)産地の異なる Acacia Mangium 造林木にお ける材質指標の樹幹放射方向変動,第56回日本木材学会大会研究発表要旨集,22.
- 伊藤聡美・柴田正志・熊澤勉・安部久・藤井智之・緒方健(2004)輸入合板の表面単板(表板、裏板)に おけるレッドメランチ材の使用割合、木材工業, **59**(5), 217-220.

角谷宏二 (2007) 違法伐採対策推進国際セミナー2007 in 東京 抄録集

- Ogata, K., Fujii, T., Abe, H., and Baas, P. (2008) Identification of the timbers of Southeast Asia and the Western Pacific, Kaiseisha Press, 400p.
- 地球・人間環境フォーラム (2008) 平成 19 年度違法伐採による環境影響調査業務報告書, 184.

(木材特性研究領域 安部久)

# 第2章 木材抽出成分の化学分類学的手法による樹種識別技術の開発

#### ア 研究目的

Shorea 属はフタバガキ科の中では最も種類が多く、経済的にも重要な属である。Shorea 属は、木材流 通や利用の現場においては、心材色の特徴などを基に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(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ティを用いた合板の関税率は他の樹種の合板より 高いため、特に Rubroshorea 節を簡単かつ迅速に判定する方法が求められている(伊藤ら, 2004)。

植物分類の手法の一つとして、化学成分の分析結果に基づいて植物を分類するケモタクソノミー(化 学植物分類)が古くから行われている。木材の化学成分の内、主要成分(セルロース、ヘミセルロース、リ グニン)は樹種による差は小さいが、フェノール類のような抽出成分は心材に多く含まれており、量的にも 質的にも樹種による特徴が大きく現れるため、この分布に基づく大まかな分類が可能である。心材成分は 材色にも大きな影響を及ぼしており、木材を目視で識別する際の識別拠点の一つともなっている。*Shorea* 属については、樹脂(Bisett et al., 1971)や葉(Joshi et al., 2004)の分析に基づくケモタクソノミーが行わ 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、心材の抽出成分については、レスベラトロールオリゴマー類 (Sotheeswaran & Pasupathy, 1993; Hirano et al., 2003a)や加水分解型タンニン関連成分(Hirano et al., 2003b)が単離されているものの、系統的なケモタクソノミーに関する研究は行われていない。

本研究では、材色による識別の可能性について検討するとともに、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ティ(Rubroshorea節)識別法を開発した。

#### イ 研究方法

#### 1. 試料

森林総合研究所木材標本庫で所蔵する木材標本を試料とした。

# 2. 心材色の測定

色彩色差計を用い、Shorea 属心材部の明度、黄色度、赤色度を測定し、4 つのグループの特徴を明らかにした。

#### 3. 心材成分の単離と構造決定

Shorea 属 13 種、Shorea 属以外のフタバガキ科木材 5 種の心材木粉を室温下、メタノールで抽出し、 抽出物を濃縮後、ヘキサンで抽出した。ヘキサン不溶部を、遠心液々分配クロマトグラフィー(CPC) (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O)で分離した。分離した各画分を Sephadex LH-20 のカラムクロマトグラフィー(EtOH) およびシリカゲルのカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>-MeOH)等で精製し、心材成分を単離した。単離した 成分について、NMR、MS 等の機器分析を行い、既知データと比較することにより構造を決定した。

### 4. Shorea 属におけるガリック酸の分布とレッドメランティ識別技術の開発

Shorea 属 50 種の心材抽出成分について薄層クロマトグラフィー (TLC) および <sup>1</sup>H-NMR スペクトルにより、ガリック酸の分布を明らかにした。ガリック酸検出のための展開溶媒や発色試薬等の諸条件を検討し、 TLCによるレッドメランティ識別技術を開発した。合板工場で採取した単板(第4章参照)について、この 手法を適用した。

#### ウ・エ 結果および考察

# 1. 心材色による識別

材色分布によりレッドメランティを完全に識別することは困難であったが、ある程度のグループ毎の分布の差は認められた。通関の現場で例外扱いとなっているため問題となっている *S.albida*(アラン)はダークレッドメランティよりも黄色度が高く、ライトレッドメランティよりも赤色度が高い傾向にあった。

# 2. 心材成分の分布と識別

Shorea 属を中心とするフタバガキ科の心材から、新規物質を含む多種多様なレスベラトロールオリゴマ 一類(図 2-1)およびガリック酸などの加水分解タンニン類(図 2-2)が単離された(表 2-1)。レスベラトロー ルは、スチルベンの一種で、近年、抗ガン・抗酸化・アンチエイジング作用が注目されている物質であり、 その重合物がブドウ科、フタバガキ科、マメ科などの植物に分布している。レスベラトロールオリゴマー類 は構造が非常に複雑で、類似した構造の混合物として存在するため、分離や困難な物質であるが、遠心 液々分配クロマトグラフィー等を組み合わせることにより、単離が可能になった。Shorea 属においては shorealactone が広く分布していたが、このスペクトルデータは既知の laevifonol (Hirano *et al.*, 2003a)と同 ーであった。その構造を精査した結果、報告された laevifonol の構造は誤りであることが確認された。既報 のレスベラトロールオリゴマー類の中には、その構造が疑わしいものがあり、精査する必要がある。



図 2-1 Shorea 属心材から単離された主なレスベラトロールオリゴマー類

# 表 2-1 フタバガキ科木材心材部におけるフェノール性成分の分布

W: White meranti, Y: Yellow meranti, R: Red meranti, B: Balau

RO2: resveratrol dimer, RO3: resveratrol trimer, RO4: resveratrol tetramer, ROG, resveratrol oligomer glucoside

		1	1	1	1	1	T T	r –	T T	T T	1	1	1	1	1	1	1	1	<del></del>
		Shorea hypochra (W)	S.hopeifolia (Y)	S.albida (R)	S.negrosensis (R)	S.pauciflora (R)	S.almon (R)	S.polysperma (R)	S.squamata (R)	S.parvifolia (R)	S.platyclados (R)	S.dasyphylla (R)	Sjohorensis (R)	S.laevis (B)	Hopea pierrei	H.sangal	Anisoptera glabra	Parashorea melaanonan	Pentacme contorta
	ε−viniferin			+		+									+				
	ampelopsin A	+++		+	+	+					+			+++					
	ampelopsin C														+				
	ampelopsin F														+				
PO2	balanocarpol	+				+								+					
RUZ	heimiol A	+												+					
	hopeafuran	+		+															
	malibatol A	+																	
	shorealactone	++	++	+	+	+		++	++	++	++	+	+	++					
	shoreaketone	+	+	+	+	+								++					
	α−viniferin		+			+													
	vaticanol A														+				
RO3	vaticanol E														+				
	vaticanol G														+++				
	pierreol														+				
	hemsleyanol C					+													
	hemsleyanol D					+					+								
RO4	vaticanol B		+			+					+	+					+		+
TTO 4	vaticanol C														++				
	hopeaphenol	+	++	+	+	++		+	+		+			+		+	+++		+++
	isohopeaphenol					+					+	+							
	pauciflorol B														+				
	resveratrol 12C-Glc						++					+							
	diptoindonesin A					+													
	paucifloroside I					++													
ROG	hemsleyanoside B						++												
	almonoside A						++												
	almonoside B						+												
	pauciflorosid II					+													
<u> </u>	vaticacoside E														++				
НТ	gallic acid			++	+++	+++	+	++	++	++	++	++	++			++		++	
	bergenin			+	++	+			++	+	+					++			



図 2-2 Shorea 属心材から単離された加水分解型タンニン関連成分

単離された多くの成分は重複して存在しており、多くの場合、分布表のみから種レベルの識別を行うことは困難であった。しかし、*S.almon*からは shorealactone などのレスベラトロール類そのものは単離されず、単離されたものはすべて C-配糖体であった。このような特徴的な分布を示す種については、種レベルでの識別も可能と思われる。ガリック酸やbergeninのような加水分解型タンニン関連成分は Shorea 属においてはレッドメランティのみから単離された。ガリック酸自体は無色であるが、酸化により容易に赤変することから、この存在が間接的に心材色に関与しているものと思われる。

# 3. ガリック酸を指標としたレッドメランティの識別

Shorea 属におけるガリック酸の分布について TLC を用いて検討した結果、ホワイトメランティ、イエロー メランティ、バラウの試料ではガリック酸に相当するスポットは認められなかったが、レッドメランティについ てはすべての試料でガリック酸のスポットが確認された(図2-3,表2-2)。心材抽出成分の<sup>1</sup>H-NMRスペク トルにおいても、レッドメランティでは、ガリック酸に由来する 7.04ppm のシグナルが認められたが、他のグ ループでは認められなかった。



#### 図 2-3 Shorea 属心材抽出成分および標準物質の TLC パターン

S.hypochra (White meranti), 2: S.gibossa (Yellow meranti), 3: S.laevis (Balau)
 4: S.polysmerama (Red meranti), 5: S.negrosenseis (Red meranti)
 6. S.pauciflora (Red meranti), 7: gallic acid, 8: shorealactone

White Meran	ti	Yellow Meran	ti	Red	Me	ranti		Balau	
(Anthoshorea	()	(Richetioides	)	(Rubr	osk	norea)		(Shorea)	
S.ochracea	_	S.xanthophylla	_	S.dasyphylla	+	S.quadrinervis	+	S.inaequilateral	is –
S.polita	_	S.faguetiana	_	S.parvistipulata	+	S.negrosensis	+	S.kunstleri	_
S.symingtonii	_	S.gibbosa	_	S.curtisii	+	S.macroptera	+	S.venulosa	_
S.floribunda	_	S.hopeifolia	-	S.leprosula	+	S.amplexicaulis	+	S.havilandii	_
S.gratissima	_	S.patoensis	_	S.pauciflora	+	S.monticola	+	S.gisok	-
S.hypochra	_	S.illiasii	-	S.amplexicaulis	+	S.parvifolia	+	S.teng	_
S.philippinensis	_	S.kudatensis	_	S.almon	+			S.robusta	-
S.bracteolata	_	S.multiflora	_	S.gysbertsiana	+			S.laevis	-
S.agami	_	S.mujongensis	_	S.leptoclados	+			S.malibato	-
S.talura	-	S.acuminatissima	-	S.polysperma	+			S.domatiosa	-
				S.scabrida	+			S.guiso	-
				S.rubella	+			S.seminis	-

表 2-2 Shorea 属におけるガリック酸の分布

+:検出,一不検出

ガリック酸は単純なフェノール酸で、容易に入手可能であり、レッドメランティの指標成分として有効であ ることが示唆されたので、これを簡易に識別する手法として TLC の諸条件を検討した(Sharma et al., 1998)。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という利点がある。シリカゲルの TLC では、ガリッ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、テーリングを起こしやすかったが、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。発色試薬としては隣接するフェノール性水酸基を有するものに反応する塩化第二鉄溶液が 最適であった。ガリッ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、shorealactone のようなレスベラトロールオリゴマー類は呈色しないため、好都合であった(図2-3)。ガリック酸の検出限界 はおよそ 0.2 μgであった。以下に具体的な手順を示した。

#### TLC を用いたレッドメランティの識別手順

(1)20mgの心材木粉を室温下、時々撹拌しながら4mlのメタノールで抽出する。

(2) 濾別し、濾液を減圧下で濃縮・乾固させた後、残留物を50μ1のアセトンで溶解する。

(3)5µ1 のアセトン溶液(試料および標品のガリック酸)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)展開溶媒(クロロホルム:酢酸エチル:蟻酸, 5:4:1,v/v)を入れた展開槽に TLC プレートをつける。

(5)展開後、プレートを加熱し溶媒を除去する。

(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。

(7)塩化第二鉄(1%,メタノール溶液)をプレートに噴霧する。

(8) 試料のスポットおよびガリック酸の濃青色のスポットを比較、確認する。

この手法を合板工場より採取した単板に適用した結果、顕微鏡観察、DNA 分析(第4章参照)でレッド メランティと判断された全ての試料について、ガリック酸が検出され、レッドメランティであることが確認され た。DNA 分析は乾燥単板では困難な場合があるが、この手法では、熱による影響は見られなかった。した がって、本手法はレッドメランティの簡易識別法として実用可能であることが実証された。

#### オ 今後の問題点

Shorea属におけるガリック酸の分布から、これを指標としてTLCを用いてレッドメランティ類を識別できる ことが明らかとなった。この手法を一般化するためには、フタバガキ科の他の属やフタバガキ科以外の木 材におけるガリック酸の分布を明らかにする必要がある。

#### カ 要約

心材色にはある程度のグループ毎の分布の差は認められたが、材色だけでレッドメランティを完全に識別することは困難であった。Shorea属を中心とするフタバガキ科の心材から、新規物質を含む多種多様なレスベラトロールオリゴマー類およびガリック酸などの加水分解タンニン類が単離された。Shorea属においては shorealactone が広く分布していた。Shorea属におけるガリック酸の分布につい検討した結果、レッドメランティのみに存在していたため、これを指標成分として、TLCによってレッドメランティを識別できることが明らかとなった。この手法により、合板用レッドメランティ単板からも、微量のガリック酸が検出されたことから、簡易識別法として実用可能であることが実証した。

#### キ 引用文献

- Bisset, N. G., Chavanel. V., Lants, J. P and Wolff, R. E. (1971) Constituants sesquiterpéniques et triterpéniques des résines du genre Shorea, Phytochemistry, 10, 2451-2463.
- Hirano, Y., Kondo. R. and Sakai, K. (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, 308-312.
- Hirano, Y., Kondo. R. and Sakai, K. (2003a) Novel stilbenoids isolated from the heartwood of *Shorea laeviforia*, J Wood Science **49**, 53-58.
- Hirano, Y., Kondo. R. and Sakai, K. (2003b) 5 α-Reductase inhibitory tannin-related compounds isolated from *Shorea laeviforia*, J. Wood Science, **49**, 339-343.
- 伊藤聡美,柴田正志,熊澤勉,安部久,藤井智之,緒方健(2004)輸入合板の表面単板(表板、裏板) におけるレッドメランチ材の使用割合、木材工業,**59**(5),217-220.
- Joshi, K., Seneviratne, G. I. and Senanayake, S. P. (2004) Leaf flavonoid aglycone patterns in the species of Dipterocarpaceae in Sri Lanka. Biochemical Systematics and Ecology, **32**, 329-336.
- Sharma, O. P., Bhat, T. K. and Singh, B. (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, 167-171.
- Sotheeswaran, S. and Pasupathy, V. (1993) Distribution of resveratrol oligomers in plants, Phytochemistry, **32**, 1083-1092.

(バイオマス化学研究領域 加藤厚)

# 第3章 安定同位体比による木材の産地識別

# ア 研究目的

植物由来の農産物の産地識別技術としては、安定同位体比・無機元素濃度等を用いる化学的手法 (Kagawa et al., 2002)が存在し、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(Kim & Smith, 2002; Martin et al., 1988; Robards & Antolovich, 1995; Weinert et al., 1999)、 大豆や米などの穀物(法邑ら, 2005; 織田・川崎, 2002)やコカイン(Ehleringer et al., 2000)等の産地識別 がすでに行われている。一方、木材の産地識別の研究としては、産地未知と産地既知の木材の年輪幅 時系列の相関(*t*値)を計算し、*t*値が最大になる点を未知試料の産地とすることで、未知材の産地を推定 する手法、"dendroprovenancing"(Eckstein et al., 1975)が存在する。この手法は、年輪幅が生育地の気 候を反映しているため、産地が近い個体の年輪幅時系列同士は高い相関を示すという事実に基づいて いる。年輪幅に比べて年輪の安定同位体比は個体差が小さいため(Kagawa et al., 2003; Nakatsuka et al., 2004)、安定同位体比を用いることによりさらに精度の高い産地識別が期待できる。そこで本研究では すでに農産物の産地識別の手法として実用化されている安定同位体比・無機元素濃度を違法伐採問題 が最も深刻な東南アジア地域の樹種(レッドメランティ)に適用し木材の産地識別の可能性を調べた。また、 年輪を形成するアメリカ産マツ材を用いて、炭素安定同位体を用いた同位体年輪気候学的産地同定法、 "isotope dendroprovenancing"を試み、その有効性について調べた。

# イ 研究方法

# 1. 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、産地情報が明らかな 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(図 3-1)、試料の安定同位体比・無機元素が産地の緯度・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 ドメランティが異なるグループに分かれるかどうかを調べた。アメリカ産マツ材の炭素同位体比時系列 (Leavitt et al., 2007)は米国海洋大気庁のデータベースに登録されているものを用いた。



図 3-1 レッドメランティ試料の産地と降水のδ<sup>18</sup>O 値の年平均値の分布 (IAEA/WMO, 2001)

#### 2. 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。年輪が 見られない熱帯材の場合、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を形成層 から髄付近まで半径方向に沿って取ることが望ましい。そこで標本の木口面から半径方向に、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 ミクロン以下に粉砕後、得られた木粉を酸素 (δ<sup>18</sup>O)・炭素(δ<sup>13</sup>C)・窒素(δ<sup>15</sup>N)同位体比測定用にそれぞれ 0.1mg, 2.0mg, 10mg 秤量した。炭素・ 窒素同位体比は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 Scientific MAT252)の複合システム、また酸素同位体比は北海道大学低温科学研究所の高温熱分解型 元素分析計(TC/EA Thermo Scientific)と質量分析計(Delta Plus XL Thermo Scientific)の複合システム を用いて測定した。

# 3. 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 140℃で 4 時間湿式灰化した。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 元素を選んだ。

# 4. 同位体年輪気候学的産地同定(isotope dendroprovenancing)

年輪幅による木材の産地同定手法(Eckstein et al., 1975; Haneca et al., 2005)を米国海洋大気庁 (NOAA)のホームページ上で公開されているアメリカ南西部産のマツ属(*Pinus edulis, Pinus monophylla*) 年輪の炭素同位体比時系列データ(Leavitt et al., 2007)(http://www.ncdc.noaa.gov/paleo/treering/ isotope/iso-drought.html)に適用し、本手法の有効性を調べた。



図 3-2 同位体年輪気候学的産地同定法の検証に用いたアメリカ南西部産のマツ属試料の産地

アメリカ南西部の6州にある14サイト(Alton, Kane Spring, Dry Canyon, Aztec, Cerro Colorado, NC AZ, NE AZ, Lemoille, Gate Canyon, Owl Canyon, Hawthorne, Lower Colonias, Ozene, Mimbres)が選ばれ (図 3-2)、各サイト4個体以上から4本の成長錐コアが用いられている。年輪は年代決定後、5年毎に切り分けられ(1900-1904、1905-1909、…、1975-1979)、粉砕・セルロース抽出後、炭素同位体比が測定さ れた。炭素同位体比時系列は以下のように標準化後(Hollstein, 1980)、

$$\delta^{13}C_i(Holl) = \log\left(\frac{\delta^{13}C_i}{\delta^{13}C_{i+1}}\right)$$

任意の1 サイトの試料を産地未知のものと仮定し、未知試料の炭素同位体比時系列と残りの13 サイトの炭素同位体比時系列との相関を以下のように計算することにより産地同定を行った(Eckstein et al., 1975; Haneca et al., 2005)。

$$t_H = \frac{r\sqrt{n-2}}{(1-r^2)}$$

δ<sup>13</sup>C<sub>i</sub>:5年区分で区切った場合のi番目の炭素同位体比データ
 δ<sup>13</sup>C<sub>i</sub>(Holl):標準化(Hollstein, 1980)後のi番目の炭素同位体比データ
 r:産地未知試料と既知試料の炭素同位体比時系列間の相関係数
 n:産地未知試料と既知試料で年輪形成年が重複する期間(1790-1979)のデータ数

アメリカ南西部におけるt<sub>H</sub>値の分布の中で値が最大になる地点を未知試料の産地と推定した。また、 推定した産地と実際の産地との距離を誤差とした。この手法による産地推定の必要条件として、未知試料 の実際の産地が既知試料の産地によって周辺が囲まれていることが挙げられる。そこで、14 サイトの分布 の中心に位置するためこの条件を満たしている Kane Spring, Alton, Dry Canyon の3 サイトの木材を未知 試料と仮定して同位体年輪気候学的産地同定法の検証を上記の方法で行った。

#### ウ・エ 結果および考察

## 1. 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 機元素濃度と緯度・経度との間には有意な相関は見られなかった(表 3-1、図 3-3)。調べた分析パラメー タのうち、1番目と2番目に緯度・経度との間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、特に酸素 同位体比が Shorea 材の産地識別に有効なことが示唆された(図 3-4)。しかしながら、ボルネオ島内の異 なる地域(サバ、サラワク、ブルネイ)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、図 3-1)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。

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 3-1)、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(図 3-5)、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(高田ら, 1993)。



図 3-3 木材の酸素同位体比と産地緯度(北緯)との関係



図 3-4 酸素-炭素同位体比 2 次元マップによる木材の産地識別

		$\delta$ <sup>18</sup> O	$\delta^{13}C$	$\delta$ <sup>15</sup> 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

表 3-1 木材の安定同位体比・無機元素濃度と産地の緯度・経度との相関係数

*P* < 0.005 \* *P* < 0.05



図 3-5 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)

#### 2. 同位体年輪気候学的手法による木材の産地同定

ある1 サイトの未知試料の年輪の炭素同位体比時系列とそれ以外の13 サイトの炭素同位体比時系列の*t<sub>H</sub>*値の分布を計算したところ(図 3-6)、実際の産地と推定された産地(*t<sub>H</sub>*値が最大になる地点)との距離は100-300kmと小さく、熱帯材の場合に比べて良い産地識別の空間識別精度が得られた。

熱帯材では明瞭な年輪が形成されないために、同一形成年の木部の同位体比同士を複数年にわたって比較することができないという問題があった。このため、熱帯材では長期間の平均値一点での比較になり、産地識別の空間精度が1000km以上と低かった。しかしながら、四季の明瞭な温帯一冷帯材では年輪が形成されるために安定同位体比の時系列を作ることが可能であり、そのため同一形成年の年輪を複数年で比較することが出来るという長所がある。以上の理由から、同位体年輪気候学的手法による温・冷帯材の産地の空間識別精度が100-300kmと、熱帯材の精度(1000km以上)と比べて改善されたと考えられる。











# 図 3-6 同位体年輪気候学的手法による 3 サイト(a. Kane Spring, b. Alton, c. Dry Canyon) の米国産木材の産地識別結果

白色円の場所が各試料の産地に対応し、円の大きさ、円付近の数字が*t<sub>H</sub>*値を表す。計算された*t<sub>H</sub>*値の分布の中で、実際の産地(×印)付近で*t<sub>H</sub>*値が最大になり、実際の産地と推定された産地間の距離は100km-300kmであった。炭素同位体比時系列を用いて同一形成年の年輪同士を複数で比較することにより、産地識別の空間精度が改善されていることがわかる。

#### オ 今後の問題点

税関、検疫所等において実用レベルでの木材の産地識別を行うためには、生産国が特定できる程度 に産地識別の空間識別精度が高いことが必要条件である。明瞭な年輪の形成される温・冷帯材は、年輪 の形成されない熱帯材に比べて安定同位体比を用いた産地識別の精度が高く、実用レベルでの産地識 別が実現できる可能性が高い。今後は、高い精度での産地識別が可能な木材に優先して取り組む必要 がある。短期的には、より試料の入手が容易なスギやヒノキのような主要国産材や、樹木が年輪を形成す る温・冷帯域でかつ違法伐採が深刻なシベリア・中国産材の同位体比時系列データベースを構築し、こ れらの木材の産地識別を可能にする必要がある。また、熱帯産でもチークのように例外的に年輪を形成 する樹種もあり、これも同位体比時系列データベースを構築することにより産地識別が可能になると思わ れる。違法伐採が最も深刻な地域は熱帯に集中している。Shorea などの年輪を形成しない樹種でも、目 に見えない安定同位体比の年輪が存在することが報告されており(Evans & Schrag, 2004)、長期的には年 輪の見られない熱帯産材でも産地識別も行えるように安定同位体比分析技術を改良していく必要があ る。

## カ 要約

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

も有効であった。一方、無機元素は産地の緯度・経度とは相関が無い代わりに、一部は産地の土壌水分 条件に影響を受けていた。安定同位体比により、1000km程度離れたフィリピン産とボルネオ産の木材は 区別できたものの、ボルネオ島内の異なる地域の木材は区別できなかった。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。一方、明瞭な年輪が形成される北米産マツ材では、年輪を用いて安定同位体比の時系 列が構築できるため、産地既知と産地未知の木材の同位体比時系列間で相関係数を計算することがで きる。相関係数が最大となる地点を未知木材の産地とする同位体年輪気候学的産地同定法により、熱帯 材の精度(>1000km)に比べてより高い精度(100-300km)での木材の産地識別が可能であった。この ように、明瞭な年輪の形成される温・冷帯産材は明瞭な年輪の形成されない熱帯材よりも高い精度での 産地識別が可能である。

#### 謝辞

同位体年輪気候学的産地同定法(isotope dendroprovenancing)を検証するにあたり、アメリカ南西部産 のマツ属年輪の炭素同位体比時系列データを提供して下さったアリゾナ年輪研究所の Steven W. Leavitt 博士他の方々に感謝します。また、酸素同位体比測定を引き受けて下さった北海道大学低温科 学研究所の中塚武准教授に感謝します。

# キ 引用文献

- Eckstein, D., Brongers, J.A. and Bauch, J. (1975) Tree-ring research in the Netherlands, Tree-ring bulletin, **35**, 1-13.
- Ehleringer, J., Casale, J. F., Lott, M. J. and Ford, V. L. (2000) Tracing the geographical origin of cocaine, Nature **408**, 311-312.
- Evans, M. N. and Schrag, D. P. (2004) A stable isotope-based approach to tropical dendroclimatology, Geochimica et Cosmochimica Acta, **68**, 3295-3305.
- 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.
- Haneca, K., Wazny, T., Acker, J.V. and Beeckman, H. (2005) Provenancing Baltic timber from art historical objects: success and limitations, Journal of Archeological Science **32**, 261–271.
- Hollstein, E. (1980) Mitteleuropaeische Eichenchronologie, Verlag Phillipp von Zabern, Mainz am Rhein.
- 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.
- IAEA/WMO (2001) Global Network of Isotopes in Precipitation, http://isohis.iaea.org
- Kagawa, A., Aoki, T., Okada, N. and Katayama, Y. (2002) Tree-Ring strontium-90 and cesium-137 as potential indicators of radioactive pollution, J. Environ. Qual. 31, 2001-2007.
- Kagawa, A., Naito, D., Sugimoto, A. and Maximov, T. C. (2003) Effects of spatial and temporal variability in soil moisture on widths and δ <sup>13</sup>C values of eastern Siberian tree rings, J. Geophysical Research, **108** (D16) doi:10.1029/2002JD003019.
- Kim, A. A. and Smith, B. W. (2002) Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee, J. Agric. Food Chem., 50, 2068-2075.
- Leavitt, S. W., Chase, T. N., Rajagopalan, B., Lee, E., Lawrence, P.J. and Woodhouse, C. A. (2007) Southwestern U.S. drought maps from pinyon tree-ring carbon isotopes, Eos Tran. Am.

Geophys. Union, 88(4), 39-40.

- Martin, G. J., Guillou, C., Martin, M. L., 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.
- Nakatsuka, T., Ohnishi, K., Hara, T., Sumida, A., Mitsuishi, D., Kurita, N. and Uemura, S. (2004) Oxygen and carbon isotopic ratios of tree-ring cellulose in a conifer-hardwood mixed forest in northern Japan, Geochemical Journal, **38**, 77-88.
- 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.
- Robards, K. and Antolovich, M. (1995) Methods for assessing the authenticity of orange juice. A review, Analyst, **120**, 1–28.
- 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.
- Weinert, B., Manuela, U. and Mosand, A. (1999) GC-IRMS analysis of Ceylon, Assam and Darjeeling teas, Z. Lebensm. Unter Forsch., 208, 277-281.

(木材特性研究領域 香川聡)

# 第4章 木材からの DNA 抽出法と遺伝子検出技術の開発

## ア 研究目的

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(藤田, 2003)や犯罪捜査での個人の識 別、親子鑑定(福島, 2003)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(De Filippis & Magel, 1998; Dumolin-Lapègue et al., 1999; Ohyama et al., 2001; Deguilloux et al., 2002, 2004; Tani et al., 2003; Reynolds & Williams, 2004; Asif & Cannon, 2005)。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知られているが(Deguilloux et al., 2002)、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、また、熱処理によってど のように変わるかは不明であった。

そこで、木材や木材製品の DNA 分析による樹種識別技術の開発を目指し、次の4点について明らか にすることを目的とした。

1. 木材の部位の違いが DNA の抽出効率、DNA の質およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction、PCR)法による遺伝子検出に及ぼす影響

2. 木材への熱処理が DNA の抽出効率、DNA の質および PCR 法による遺伝子検出に及ぼす影響

3. 木材由来 DNA からの遺伝子検出における、PCR 阻害物質の影響を緩和するとされる試薬の効果

4. 開発した方法の木材製品(合板用単板)への適用の可否

# イ 研究方法

# 1. 供試木材

10 種の広葉樹および針 葉樹を実験に用いた(表 4-1)(吉田ら, 2006)。木材 の部位別の DNA 抽出効率 の検討には、幹の円盤より、 樹皮から髄に達する楔状の 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

	表 4-1 供試木材	才		
樹種		採取年	採取地	標本番号
				(TWTw)
ヤマグワ	Morus australis Poir.	2004	札幌	21871
エゾヤマザクラ	Prunus sargentii Reher	2004	札幌	1795
ハクウンボク	Styrax obassia 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	Salix uensis Trautv. et C.A.Mey.	2004	札幌	21803
オニグルミ	Juglans manshurica Maxim.	2004	札幌	21802
	var. <i>sieboliana</i> (Maxim.) Makino			
グイマツ	<i>Larix gmelinii</i> Rupr. ex Kuzen.	2004	札幌	21814
	var. <i>japonica</i> (Maxim. ex Regel) 1	Pilg.		
チョウセンゴヨウ	Pinus koraiensis Sieb. et Zucc.	2004	札幌	21832
モミ	Abies firma Sieb. et Zucc.	2004	札幌	21864
イチョウ	<i>Ginkgo biloba</i> L.	2004	札幌	21789

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辺材木口面を外側から 1cm の厚さで除き、さらに 2mm 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。

国内の合板工場(株式会社マルヒ)にて単板を収集し、目視により節レベルで分類した。レッドメランティと判定した単板については、生材状態の単板の一部を工場ライン(190~200℃)で乾燥した。

#### 2. 木粉の調製

のみとかなづちを使用して割り箸程度の太さに各木材試料を細割した後、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:3117-0500)に小木片約1g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(安井機械: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。

## 3. DNA の抽出

DNA の抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン)および DNeasy Plant Maxi Kit の QIAshredder Maxi Spin Column を使用し、以下の手順で行った。遠心分離操作は室温(設定温度 25℃)で行った。

1) 木粉 1g を乳鉢に入れ、4ml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、その場合には暖めて溶解する。)

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 が融けてからもさらに約5分間すりつぶす。

3)50ml の遠心チューブ(スクリューキャップ付コニカルチューブ)に薬さじの小さい方で移し、1ml の AP1 バッファーでさじに付いた試料を洗い落とす。10 分間 65℃で保温する。

4) 1.625mlの AP2 バッファーを加え、氷上に 10 分間置く。

5) AP1 バッファーでバランスを取り、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。

カラムを通り抜けた溶液を15mlの遠心チューブに移す。次に5)で沈殿した木粉を薬さじ(小さい方)で
 6)で使用した QIAshredder Maxi Spin Column に入れ、6)と同じ条件で遠心分離し、カラムを通り抜けた溶液を先の15 ml 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  $\mu$  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 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) 0.6mlのAWバッファーをカラムに加え、6,000 xgで1分間遠心分離する。通り抜けた溶液は捨てる。 10) 0.5mlのAWバッファーをカラムに加え、17,000 xgで5分間遠心分離する。

11) カラムを新しい 1.5ml 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 で1 分間遠心分離して DNA を溶出させる。この操作をもう一度繰り返し、通り抜けた溶液を合わせて DNA 溶液を得る。

# 4. 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)を用い、測定バッファー(10mM トリス塩酸緩衝 液(pH7.5)、1mM エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム、100mM 塩化ナトリウム、 $0.1 \mu$ g ml<sup>-1</sup> Hoechst33258(インビトロジェン))1ml に  $2 \mu$ 1の試料溶液を混和し、励起波長 352nm、測定波長 455nm にて測定した。標準物質として既知濃度の  $\lambda$  DNA を使用した。DNA の鎖長は、DNA(250ng)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。

# 5. PCR

葉緑体 DNA に存在するリブロース-1,5-二 /酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ大サユニット遺伝子(*rbcl*) シトコンドリア DNA k contained and a contained

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)の内部転写スペー サー1 領域(ITS1)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 4-2 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、イチョウおよび

プライマー名	配列(5'-3')	文献
rbcL-F	GGACTTACCAGTCTTGATCG	吉田ら, 2006
rbcL-R	TCACATGTACCTGCAGTAGC	吉田ら, 2006
cox1-F	CGGTCTTCGGGTATCTAGGC	吉田ら, 2006
cox1-R	TCCATCCAGCGTAAGCATCT	吉田ら, 2006
rDNA-F1	GAACCTGCGGAAGGATCATTC	計 吉田ら,2006
rDNA-F2	CGTGATGGGGGATAGATCATTG	C吉田ら, 2006
LAITS1B	CCAAGGGCCTTGCATCAT Ge	ernandt & Liston, 1
ITS1N	CGTAACAAGGTTTCCGTAGG	Wei & Wang, 2004
rDNA-R1	AGTCCCGCCTGACCTG	吉田ら, 2006
rDNA-R2	CAGCGACAACAAGCAATGC	吉田ら, 2006
rDNA-R3	TCCCTTGACCCAACCACC	吉田ら, 2006

表 4-2 PCR に用いたプライマーの配列

オノエヤナギ: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  $\mu$ 1の GoTaq Green Master Mix 溶液に 0.5  $\mu$  M のプライマーおよび一定量の DNA (典型例では 50ng ま たは DNA 溶液 5  $\mu$  1)を加え、滅菌水にて 25  $\mu$ 1 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  $\mu$ 1の 2 x Ampdirect Plus 溶液に 0.25  $\mu$ 1(0.625 ユニット) の Blend Taq -Plus-(東洋紡績)、0.5  $\mu$  M のプライマーおよび一定量の DNA を加え、滅菌水にて 25  $\mu$ 1 に調製した。PCR は、95°C・90 秒の変性に続き、95°C・30 秒、58°C・30 秒、72°C・1 分を 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。

#### 6. 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。

#### ウ・エ 結果および考察

# 1. 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 4-3)。 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 4-1)。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 250bp から 2,000bp の範囲にあり、

表 4-3 放射方向の部位の違いと DNA 抽出効率

		DNA	抽出効率	ε (μg g <sup>-1</sup>	wood)
	樹種		部在	立	
		外(樹	皮)側◀━	▶ 内(髄)	)側
ヤマグワ	Morus australis	13.9	2.3	1.6	1.0
エゾヤマザクラ	Prunus sargentii	8.3	0.8	0.3	0.2
ハクウンボク	Styrax obassia	7.5	6.1	5.2	1.5
ミズナラ	Quercus crispula	7.1	0.8	0.4	0.3
オノエヤナギ	Salix udensis	1.5	0.5	0.2	0.3
オニグルミ	Juglans mandshurica	0.3	0.3	0.3	0.1
	var. <i>sieboldiana</i>				
グイマツ	Larix gmelinii	17.2	0.0	0.0	0.0
	var. <i>japonica</i>				
イチョウ	Ginkgo biloba	4.2	2.4	1.4	0.1
チョウセンゴヨウ	Pinus koraiensis	1.0	0.1	0.1	0.0
モミ	Abies firma	0.5	1.2	0.1	0.0

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)





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 125bp から23,000bp、50bp から10,000bp の範囲にあることが報告されており(Reynolds & Williams, 2004; Asif & Cannon, 2005)、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。

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(Soltis & Soltis, 1998)、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(藤田, 2003)。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(1.4µg g<sup>-1</sup>)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 4-2)。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、チョウセンゴョウ)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 ヤナギ)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、塩基配列の決定と公共の 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。

# 2. 木材への熱処理の影響



図 4-2 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

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 4-3A)。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 4-3B)。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 4-4)。





# 図 4-3 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)

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 4-5)。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。

3. PCR 阻害物質の影響を緩和する試薬の効果

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 っとして PCR 阻害物質の存在や生成が想定された。 そこで、阻害物質の影響を抑える作用をもつとされる 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(吉田・西 口, 2007)。

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心材や辺材、および辺心材の 区別が不明瞭なオノエヤナギとイチョウの内側の木部 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 4-6)。

180℃で熱処理したグ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4-7A)。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4-7B)。

以上の結果より、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。

4. 合板用単板からの DNA 抽出と遺伝子の検出

これまでに開発した遺伝子検出法の、木材製品の樹種識別に対する有効性を検証するため、 合板用単板の DNA 分析を試みた。レッドメラ ンティと識別された乾燥前の単板からは DNA が得られ、PCR法によって葉緑体 DNA の4領

# 図 4-5 熱処理したグイマツ材 DNA から の遺伝子の検出

M:DNA サイズマーカー



## 図 4-6 放射方向に異なる部位の木部 DNAからの葉緑体遺伝子の増 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 4-7 熱処理した木材 DNA からの葉緑体遺伝子の 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

域を増幅できた(図 4-8)。増幅された DNA の塩基配列をもとに Shorea 葉緑体 DNA 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する樹種が見出され、これらの中に単板が由来した樹種が含まれると考えられた(表 4-4)(Fujii et al., 2007; 吉田ら, 2008)。



表 4-4 供試単板の樹種推定

試料番号	DNA 分析結果
单板-1	Shorea fallax
	S. johorensis
	S. platyclados
単板-5	S. parvifolia
単板-6	S. dasyphylla
单板-7	

#### オ 今後の問題点

合板製造工場から採取した乾燥前の単板から、識別に適した DNA 領域の増幅が可能な DNA 抽出法 および遺伝子検出方法を開発した。しかし、190~200℃で乾燥された単板からは DNA を抽出できず、最 終製品である合板の DNA 分析に必要な遺伝子の検出法を見出すことができなかった。合板の樹種識別 を行うためには、乾燥後の単板からの遺伝子検出技術の開発や、接着剤・塗料が遺伝子検出に与える 影響の解明が必要である。

#### カ 要約

木材や木材製品の樹種識別に DNA 分析技術を適用するため、市販の DNA 抽出キットを用いて分析 に使用可能な量と質の DNA を木材から得られるように操作手順を改変した。次に、これまで複数の科の 樹種について同一条件で調べられた例がない木部の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、由来および履歴が明確な日 本産 10 樹種の木材を用いて調べた。

辺材や、辺心材の区別が不明瞭な樹種の外側の木部からの DNA 抽出効率は高い場合が多かったが、 心材や内側の木部では低かった。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 あり低分子化していた。これらの多くの DNA から PCR 法によって葉緑体遺伝子(*rbcL*)、ミトコンドリア遺伝 子(*cox1*)および核遺伝子(rDNA)が増幅できた。遺伝子が増幅できない木材の DNA については PCR 阻 害物質の共存が推定された。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。 従来の試薬では DNA を増幅することができなかった上記の心材や辺材、180℃で熱処理したグイマツ辺 材の DNA から、PCR 阻害物質の影響を緩和する PCR 試薬を用いると葉緑体遺伝子を検出できた。

開発した DNA 抽出法と遺伝子検出法を合板用単板の樹種識別に応用した。組織観察からレッドメラン ティと判別された乾燥前の単板からは DNA が得られ、PCR 法によって葉緑体 DNA の4 領域を増幅でき た。増幅された DNA の塩基配列をもとに Shorea 葉緑体 DNA 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する樹種が見出され、これらの中に単板が由来した樹種が含まれ ると考えられた。

本研究で見出した DNA 抽出法と、木材由来の DNA 溶液から効果的に遺伝子を検出できる試薬は、 特別な技術や熟練が不要なため、木材の DNA 分析に広く適用できる。

# キ 引用文献

- Asif, M. J. and Cannon, C. H. (2005) DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*), Plant Mol. Biol. Rep., 23, 185-192.
- De Filippis, L. and Magel, E. (1998) Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in *Robinia* trees using RAPD-PCR, Trees, **12**, 377-384.
- Deguilloux, M.-F., Pemonge, M.-H. and Petit, R. J. (2002) Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA, Proc. R. Soc. Lond. B, 269, 1039–1046.
- 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, Ann. For. Sci., **61**, 97-104.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M.-H., Gielly, L., Taberlet, P. and Petit, R. J. (1999) Amplification of oak DNA from ancient and modern wood, Mol. Ecol., **8**, 2137-2140.
- Fujii, T., Abe, H., Kagawa, A., Kato, A and Yoshida, K. (2007) Trial identification of tree species and its origin of commercial veneer, Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify Shorea species wood and its origin, Forestry and Forest Products Research Institute, 45-49.
- 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.
- 福島弘文(2003) DNA 鑑定のはなしー犯罪捜査から親子鑑定までー, 裳華房, 129p.
- Gernandt, D. S. and Liston, A. (1999) Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae), Am. J. Bot., 86, 711-723.
- Ohyama, M., Baba, K. and 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, 81-86.
- Reynolds, M. M. and Williams, C. G. (2004) Extracting DNA from submerged pine wood, Genome, **47**, 994-997.
- Soltis, D. E. and Soltis, P. S. (1998) Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In Soltis, D. E., Soltis, P. S. and Doyle, J. J. (eds.) "Molecular systematics of plants II: DNA sequencing", Kluwer Academic Publishers, Boston, 1-42.
- Tani, N., Tsumura, Y. and Sato, H. (2003) Nuclear gene sequences and DNA variation of Cryptomeria japonica samples from the postglacial period, Mol. Ecol., 12, 859-868.
- 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,森林総研研報,5,289-298.
- 吉田和正,西口満 (2007) 木材の樹種識別のための DNA の増幅に有効な PCR 試薬の検討,第 57 回 日本木材学会大会研究発表要旨集, p.87.
- 吉田和正,安部久,加藤厚,津村義彦,藤井智之(2008)組織観察・抽出成分分析・DNA 分析による 合板用単板の樹種推定,第58回日本木材学会大会研究発表要旨集,p.94.
- Wei, X.-X. and Wang, X.-Q. (2004) Evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene and divergence of *Larix* (Pinaceae), Mol. Phylogenet. Evol., **31**, 542-553.

(生物工学研究領域 吉田和正)

# 第5章 葉緑体 DNA マーカーによるカヤ属の樹種識別技術の開発

#### ア 研究目的

カヤ属は南洋材ではないが、DNA 塩基配列解析による樹種識別に伴い産地識別が可能となる事例を 示すことを目的に、本プロジェクトの1課題として計画された。

一般的に用材としての木材は全て死細胞で構成されているが、細胞内腔には色素体由来のDNAの残 渣が残存している。 葉緑体 DNA は木材中にも保存されやすい可能性があり、このような DNA を検索する ことができれば、その塩基配列情報などによる種の識別が可能になる。

本研究課題では、針葉樹の中で木材形態的に進化のレベルが低い Torreya(カヤ)属(Taxaceae イチ イ科)を対象として、樹種識別可能な DNA マーカーを開発し、その隔離分布という特性から結果として産 地識別を可能とすることを目的とする。なお、本課題では識別マーカーの開発までを担当し、木材試料か らの一般的な DNA 抽出法の開発は第4章の課題が担当している。

#### イ 研究方法

#### 1. カヤ属の分布

カヤ属は世界で7種あり、その天然分布は日本、中国、北米に限られている。日本にはカヤ(T. nucifera)が東北地方南部以南に、またカヤの変種チャボガヤ(T. nucifera var. radicans)が主として本州の日本海側に分布する(佐竹, 1989)。中国には、T. grandis が中央部・南西部に広く分布し、また T. yunnanensis が雲南地方に分布する。さらに、希少種として T. fargesii および T. jackii が東部に分布する (Farjon, 2008)。また、北米では、T. californica が西部に広く分布するとともに、希少種として T. taxifolia がフロリダ半島西部に分布する(Farjon, 2008)。

#### 2. 材料および DNA 抽出

各分布地のカヤ属樹種の葉サンプルを収集して、DNA 試料を得ることとした。種内変異の可能性を考慮して、各樹種についてなるべく複数のサンプルを得ることを目標とした。日本産の樹種については、分布範囲を広くカバーするようなサンプルを得るようにした。改変 CTAB 法 (Murray & Thompson, 1980) または DNeasy Plant Mini Kit により DNA 抽出を行った。

#### 3. 解析対象となる塩基配列

塩基配列の比較のために、まず葉緑体 DNA 上の8カ所の領域(総塩基約 5200 ベース)、rbcL(1331 ベース)、matK(1007 ベース)、trnV intron(535 ベース)、rpl20-rps18 spacer(466 ベース)、trnL-trnF spacer(445 ベース)、rpoC2-rps2 spacer(504 ベース)、rrn5-trnR spacer(248 ベース)、trnR-trnN spacer (675 ベース)を対象として、主要な種について塩基配列解析を行って、種識別に有効な領域を探索した。これらの DNA 領域の PCR 増幅には、既報のプライマー(Suyama et al., 2000; Wang et al., 1999)を用いた。

その後、絞り込んだ数カ所の領域について、全ての樹種サンプルの塩基配列を確定し、各樹種の識別 を試みた。

#### ウ 結果

#### 1. DNAサンプル

最終的に用いたDNAサンプルは、日本産のT. nuciferaを13個体、T. nucifera var. radicansを7個体、中

国産の*T. grandis*を2個体、*T. yunnanensis*を2個体、*T. fargesii*を1個体、*T. jackii*を2個体、北米産の*T. californica*を1個体、*T. taxifolia*を3個体である。

日本産の材料については、新鮮な葉サンプルの他に、さく葉標本や材も試した。すなわち、T. nucifera

については、新鮮な葉を10個体、さく葉標本を1個 体、木材標本を2個体試した。また、*T. nucifera var. radicans*については、新鮮な葉を6個体、さく葉標本 を1個体試した。これらの試料の採取地は図5-1に 示すとおりである。

## 2. 識別に有効なDNA領域

まず8カ所の領域、rbcL、matK、trnV intron、 rpl20-rps18、trnL-trnF、rpoC2-rps2、rrn5-trnR、 trnR-trnNについて、カヤ属の主要な3種、*T. nucifera*(日本産)、*T. grandis*(中国産)、*T. californica*(北米産)を比較した。結果は、*T. californica*と*T. nucifera*、あるいは*T. grandis*との間の 識別には、rbcL、trnL-trnF、trnR-trnNなどの領域 が有効であるが、地理的により近い*T. nucifera*と*T. grandis*との間の識別には、trnL-trnF、rrn5-trnR、 trnR-trnNなどの領域が有効であることが示唆された。



したがって、以後は、rbcL、trnL-trnF、rrn5-trnR、trnR-trnNの4領域に絞って、塩基配列解析を行った。 結果を表5-1に示す。

#### 3. 各樹種の塩基配列解析と比較

#### 3.1 日本産樹種

T. nucifera(日本産)について、国内の広い範囲(東北地方から九州地方にかけて)で収集した13個体の間で、塩基配列は同一であり、種内変異は検出されなかった。2個体の木材標本は2000年岡山と2002年対馬で得られたものであるが、これらはDNA抽出が良好に行われ、塩基配列も読むことが出来て、その塩基配列は、新鮮な葉またはさく葉標本から抽出した他の11個体と全く同じものであった。このことは、比較的新しい木材サンプルについては、それからのDNA抽出による樹種識別の可能性を示すものである。

なお、さらに古い建築材料(数百年前の神社建築の材料)としてのカヤ木片からDNA抽出を試みたこと があるが、これについては、塩基配列データを得ることができず、古い木材からの抽出は難しいことが考え られた。

*T. nucifera*の変種とされる*T. nucifera* var. *radicance*(チャボガヤ)について、国内の広い範囲(中部地方から中国地方にかけて)で収集した7個体の間で、塩基配列は同一であり、かつ、*T. nucifera*とは大きく異なる結果が得られた。チャボガヤは従来*T. nucifera*の変種と考えられてきたが、ここで塩基配列を見ると、*T. nucifera*との間に、rbcLで1カ所、trnL-trnFで5カ所、rrn5-trnRで6カ所、trnR-trnNで9カ所と大きく異なり、その系統的位置付けは、明らかにカヤの変種ではなく、別種であることが明らかである。

#### 表5-1 カヤ属樹種の葉緑体DNA上の4領域の塩基配列の比較



#### 3.2 中国産樹種と北米産樹種

中国産カヤ属樹種のサンプル(*T. grandis*を2個体、*T. yunnanensis*を2個体、*T. fargesii*を1個体、*T. jackii*を2個体)について、*T. grandis*と*T. jackii*については種内変異は見られなかったが、*T. yunnanensis* でtrnR-trnNにおいて2カ所の種内変異が見られた。

北米産カヤ属のサンプル(*T. californica*を1個体、*T. taxifolia*を3個体)について、*T. taxifolia*で1個体が 他の2個体との間にrrn5-trnRとtrnR-trnNにおいて3カ所の種内変異が認められた。

なお、これら中国産および北米産の樹種で見られた種内変異については、種間の変異よりは小さいも のであり、種の識別を損ねるような大きな種内変異ではなかった。また、中国産および北米産樹種のDNA サンプルが得られる前に、一部のDNA領域の塩基配列について、DDBJデータベース(DNA Data Bank of Japan)などからダウンロードした塩基配列情報を用いて解析を試みたことがあったが、実際に自前のDNA サンプルから塩基配列を行った結果、かなり異なる塩基配列が見られるものもあった。DNA データベース については、証拠標本の記載がないものも多く、何らかの間違いが疑われても確認のしようがないことがあ る。

#### 3.3 最低限の識別に必要な領域

上記では4カ所のDNA領域について、塩基配列解析を行ったが、最低限の樹種識別を行うには、rbcL だけでも、trnL-trnFだけでも、あるいはtrnR-trnNだけでも可能であることがわかった。木材サンプルから 良好なDNAが抽出できず、短いDNA断片しか得られない場合には、このように1カ所のDNA領域だけでも 十分に識別できるといえる。

#### 3.4 カヤ属樹種間の系統関係

T. nuciferaと遠い関係にあることが明らかになったT. nucifera var. radicansの出自を検討するため、得

られた塩基配列情報を用いてカヤ属樹種の系統関係を推定した。ここでは、重複欠失は除外し、塩基置換のみを用いて、近隣結合法による結果を図5-2に示す。系統樹の枝上の数字はブートストラップ確率である。



葉緑体DNA上の4領域の塩基置換情報を用いて、Neighbor-joining method

```
図5-2 葉緑体DNA4領域の塩基配列情報に基づくカヤ属の系統関係
```

まず中国産の2種、T. yunnanensisとT. fargesilは互いに非常に近い系統関係にあり、統計的にも有意である。中国産のT. jackilはやや北米産のT. californicaに近いようであるが、この関係は統計的に有意ではない。日本産のT. nucifera var. radicansは、T. nuciferaの変種というよりも、むしろ中国産のT. grandis に近いものであることがわかった。この関係は統計的に高度に有意なものであった。

#### エ 考察

カヤ属 7 種の樹種識別を行うという当初の目的にとっては、本課題で解析した4 領域の塩基配列解析 は、十分すぎる情報であり、最低限の必要条件としては、rbcLのみ、trnL-trnFのみ、または trnR-trnNの みで識別可能であった。木材サンプルの検討を行う場合に、1 領域で可能であることは重要な要件であり、 特に短い trnL-trnF が便利であろう。カヤ属の場合、奈良、平安時代の文化財(仏像など)の材料となっ ているカヤ材の由来(日本産か中国産か)を解く重要な鍵となる可能性があり(金子ら,1998)、樹種識別 に連動する産地識別が考古学に寄与する可能性も期待される。この場合、ごく微量の木片試料からの DNA 抽出技術の開発が必須となる。

今回チャボガヤについては、研究開始当初はさほど重視していなかったが、カヤの変種という従来の見 解に大きな疑義が生じたことから、詳細な検討を行うこととなった。このような関係は形態上からだけでは 解決できない問題であり、DNA による樹種識別は、正確な分類のきっかけを与え、森林資源のインベント リーの確立に大きく寄与するものと考えられる。温帯エリアの日本においては、新たな種の発見はほとんど ありえないとも考えられているが、このような丹念なアプローチは重要である。

# オ 今後の問題点

樹種の識別にあたって、今回のカヤ属のように種数の少ない対象に関しては、1カ所の DNA 領域の塩

基配列のみの比較で十分であることが判明したが、より種数の多い樹種群や、属間や科間を統一的に比較する場合には、さらに多くの領域の情報が必須であり、またいくつかの共通領域を多くの樹種について比較できる情報を完備しようとする、いわゆる DNA バーコーディング情報 (Barcode of Life Data System; Hebert et al., 2004)の整備が必要となるであろう。

また、葉や材だけでなく、様々な組織断片からの DNA 抽出技術の開発も今後ますます重要性が増す ものと考えられる。

#### カ 要約

DNA 塩基配列解析による樹種識別に伴い産地識別が可能となる事例を示すことを目的に、カヤ属の 葉緑体 DNA の塩基配列比較による樹種識別法の開発を行った。

葉緑体 DNA 上の8 領域の塩基配列を比較したが、その結果、世界の7種のカヤ属樹種(中国4種、 日本1種、北米2種)について、rbcL、trnL-trnF、trnR-trnNのいずれかの塩基配列の比較により、各樹 種が明確に識別できることが明らかとなった。

いくつかの樹種では、塩基配列情報の種内変異が認められたが、種間の差異よりは小さなものであり、 DNA 解析による樹種識別を損なうほどのものではないことが明らかとなった。

当初予期しなかった成果として、従来はカヤの変種と考えられてきたチャボガヤが、カヤと大きく異なる 種であり、むしろ中国産の T. grandis に近い種と推定されることが明らかとなった。

#### キ 引用文献

Barcode of Life Data System: http://www.barcodinglife.com/views/login.php

DNA Data Bank of Japan: http://www.ddbj.nig.ac.jp/

Farjon, A. (2008) A Natural History of Conifers, Timber Press,

- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. and Hallwachs, W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptes fulgerator, Proceedings of National Academy of Science USA, 101(41), 14812-14817.
- 金子啓明,岩佐光晴,能城修一,藤井智之(1998)日本古代における木彫像の樹種と用材観-7,8世紀を 中心に-, MUSEUM(国立博物館) 555
- Murray, M. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acid Research, **8** (19), 4321-4325.

佐竹義輔(1989)日本の野生植物·木本 I, 平凡社, 24-25.

- Suyama, Y., Yoshimaru, H. and Tsumura, Y. (2000) Molecular Phylogenetic Position of Japanese Abies (Pinaceae) Based on Chloroplast DNA Sequences, Molecular Phylogenetics and Evolution, 16 (2), 271-277.
- Wang, X.-R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K. and Szmidt, A. E. (1999) Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *MAT*K, *RPL20-RPS18* spacer, and *TRNV* intron sequences, American Journal of Botany 86, 1742-1753.

(森林遺伝研究領域 吉丸博志)

# 第6章 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

## ア 研究目的

生物多様性条約が批准されて以来、国際的に生物多様性保全の重要性の認識が高まっている (Balmford *et al.*, 2005)。特に東南アジアの発展途上国では生物資源の消失に強い関心があり、持続的 な利用に向けての取り組みが行われている。しかしながら有用な植物の違法な持ち出しは後を絶たない。 これらの国々でも違法な植物の持ち出しを抑制する持続的な林業や環境保全への取り組みがようやく始 まった。しかしこのシステムが国全体に普及するにはかなりの時間が必要となる。国際貿易の合法性のた めには違法に収奪された植物の正確な種同定システムの構築が望まれる。

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種である。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)。フタバガキ科のなかで Shorea 属は最大の種数を含む属で有用な樹種が多い。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 鑑定の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。

そのため本研究ではフタバガキ科の Shorea 属の樹種の同定に有効な葉緑体 DNA の塩基配列情報を 用いて樹種識別データベースの構築を行った。

# イ 研究方法

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た(表 6-1)。収集した材料は合計すると *Shorea*属85種で202個体であった。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。 材料収集にあたってはマレーシア森林研究所、インドネシアのガジャマダ大学、ドイツのゲッチンゲン大 学、サラワク森林研究センター、京都大学、愛媛大学に協力をして頂いた。

収集した葉組織から DNA を抽出し、葉緑体 DNA の 4 領域(*trn*L (UAA) intron、*trn*L (UAA) 3 exon - *trn*F (GAA)、*trn*H(GUG) - *trn*K(UUU)、*psb*C and *trn*S(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(表 6-2)。

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(Saitou and Nei, 1982)。この 際に外群として Vatica bella, V. oblongifolia, Anisoptera laebis 及び Cotylelobium lanceolatumを用いた。 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った。この分岐結果の信頼性を 1000 回のブートストラップ解析を行って調査し た(Felsenstein, 1985)。これら4つの材色の分類がそれぞれ単系統である場合は、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。

衣 0-1 分析性の 1 第
----------------

Conoro	Spacing	Groups	Section no *	Origin	Countries and region	ID numbers
<u>Clenera</u>	species	Dalau	1.0	Earast Dessarah Institute Melausia	Dominaular Malausia	ID IIUIIDEIS
Snorea	atrinervosa	Balau	la	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	50035
Shorea	atrinervosa	Balau	la	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	\$0036
Shorea	biawak	Balau	1b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	07-1
Shorea	biawak	Balau	1b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	07-2
Shorea	biawak	Balau	1b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	07-3
Shorea	collina	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	323
Shorea	crassa	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	10-1
Shorea	domatiosa	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular Malaysia	3428
Shorea	falcifora	Balan	10	Koh Moi	Peninsular Malaysia	10
Shorea	falciforoidas	Dalau	10	Foract Bassarah Cantra arbaratum	Sabah Malaysia	Tc0011
Shorea	Juiciferolities	Dalau	14	Forest Research Lustitute Melausia	Sabali, Walaysia	150011
Snorea	Joxwortnyi	Balau	la	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	50014
Shorea	guiso	Balau	la	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	3402
Shorea	havilandii	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	18-1
Shorea	havilandii	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	18-2
Shorea	havilandii	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	18-3
Shorea	inappendiculata	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	19
Shorea	isoptera	Balau	3	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	3409
Shorea	laevis	Balau	1b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0124
Shorea	laguis	Balau	16	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia Kalimantan	132
Shorea	la evis	Dalau	10	DT Sari Dumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	132
Snorea	laevis	Balau	Ib	PI Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	133
Shorea	materialis	Balau	la	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	\$0020
Shorea	materialis	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0021
Shorea	materialis	Balau	1a	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1340
Shorea	maxwelliana	Balau	1b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0003
Shorea	obscura	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	390
Shorea	ochrophloia	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	376
Shorea	seminis	Balau	1a	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0444
Shorea	sumatrana	Balau	10	Forest Desearch Institute Malaysia	Penincular Malaysia	\$0032
Shorea		Dalau	10	Forest Dessensh Institute Malaysia	Deminoular Molecuie	50032
Snorea	sumairana	Dalau	18	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	50033
Snorea	sumatrana	Balau	la	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	50034
Shorea	superba	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	36-1
Shorea	superba	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	36-2
Shorea	superba	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	36-3
Shorea	acuminata	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0005
Shorea	acuminata	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0006
Shorea	acuminata	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0007
Shorea	acuminata	Red Meranti	9h	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0333
Shorea	acuta	Red Meranti	90	Lambir Hills National Park	Sarawak Malausia	3pc0355
Shorea		Red Maranti	9a 0a	Lambir Hills National Dark	Sarawak, Malausia	1-1
Snorea	acuta	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	1-2
Shorea	acuta	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	1-3
Shorea	acuta	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	1-4
Shorea	albida	Red Meranti	6	Forest Research Centre Sarawak	Sarawak, Malaysia	3-1
Shorea	albida	Red Meranti	6	Forest Research Centre Sarawak	Sarawak, Malaysia	3-2
Shorea	albida	Red Meranti	6	Forest Research Centre Sarawak	Sarawak, Malaysia	3-3
Shorea	almon	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	4-1
Shorea	almon	Red Meranti	7h	Lambir Hills National Park	Sarawak Malaysia	4-2
Shorea	almon	Red Meranti	76 7b	Forest Research Centre arboretum	Sabah Malaysia	Ts0003
Shorea		Ded Maranti	20	Lombia Hills National Dark	Saban, Walaysia	130005
Shorea	amplexicaulis	Red Meranti	8		Sarawak, Malaysia	5-1
Shorea	amplexicaulis	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	5-2
Shorea	andulensis	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0072
Shorea	argentifolia	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	6
Shorea	beccariana	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	271
Shorea	bullata	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	8-3
Shorea	curtisii	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	11-3
Shorea	curtisii	Red Meranti	9h	Lambir Hills National Park	Sarawak Malaysia	11-1
Shorea	dasuphulla	Red Meranti	96 95	Georg August University of Goettingen	Indonesia	cpe0817
Shoreu	dasyphytia	Ded Maranti	90 0h	Earset Dessensh Institute Melausia arbanatum	Damingulan Malaugia	spc0817
Snorea	aasypnylla	Red Meranti	96	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	344
Shorea	fallax	Red Meranti	/b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	11/
Shorea	fallax	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	16-1
Shorea	fallax	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	16-2
Shorea	fallax	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	16-3
Shorea	fallax	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1326
Shorea	fallax	Red Meranti	7b	Plot, Deramakot forest researve	Sabah, Malavsia	Ts1347
Shorea	fallax	Red Meranti	7h	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia Kalimantan	117
Shorea	formainoa	Red Meranti	90	Lambir Hills National Dark	Sarawak Malawia	17 1
Shorea	formuginga	Dad Maranti	9a 0a	Lambir Hills National Dark	Sarawak, Malaysia	17-1
Shorea	Jerrugineu Amidana	Ded Manut	7a 71	Lamon Fills National Palk	Danimanlan Malaysia	1/-2
Snorea	jiavijiora	Ked Meranti	/b	rorest Research Institute Malaysia arboretum	reninsular, Malaysia	3436
Shorea	johorensis	Red Meranti	7b	Lambır Hills National Park	Sarawak, Malaysia	20-1
Shorea	johorensis	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	20-2

Shorea	johorensis	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	20-3
Shorea	johorensis	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	20-4
Shorea	johorensis	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0170
Shorea	johorensis	Red Meranti	7b	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia	Ts0009
Shorea	johorensis	Red Meranti	7b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	218
Shorea	kunstleri	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	21-1
Shorea	kunstleri	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0045
Shorea	kunstleri	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0046
Shorea	lepidota	Red Meranti	9b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1290
Shorea	leprosula	Red Meranti	9b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0042
Shorea	leprosula	Red Meranti	9b	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia	Ts0006
Shorea	leprosula	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0011
Shorea	leprosula	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0012
Shorea	leprosula	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0013
Shorea	macrophylla	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	23-1
Shorea	macrophylla	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	23-2
Shorea	macrophylla	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	23-3
Shorea	macrophylla	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	213
Shorea	macrophylla	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	214
Shorea	macroptera	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0024
Shorea	macroptera	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0025
Shorea	macroptera	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0026
Shorea	macroptera	Red Meranti	9a	Plot, Deramakot FR	Sabah, Malaysia	Ts0681
Shorea	macroptera ssp. baillonii	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	24-1
Shorea	macroptera ssp. baillonii	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	24-2
Shorea	macroptera ssp. macropterifolia	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	25-1
Shorea	macroptera ssp. macropterifolia	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	25-2
Shorea	macroptera ssp. sandakanensis	Red Meranti	9a	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0184
Shorea	macroptera ssp. sandakanensis	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	3405
Shorea	mecistopteryx	Red Meranti	8	Plot, Deramakot forest researve	Sabah, Malaysia	Ts0619
Shorea	mecistopteryx	Red Meranti	8	Plot, Deramakot forest researve	Sabah, Malaysia	Ts1518
Shorea	ovalis	Red Meranti	10	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0030
Shorea	ovalis	Red Meranti	10	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0031
Shorea	ovalis	Red Meranti	10	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0179
Shorea	ovata	Red Meranti	96	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	27
Shorea	palembanica	Red Meranti	/b 71	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	368
Shorea	palosapis	Red Meranti	/b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	341/
Shorea	parvijolia	Red Meranti	90	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	28-1
Shorea	parvijolia	Red Meranti	90	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	28-2
Shorea	parvijolia	Red Meranti	90	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	28-3
Shorea	parvijolia	Red Meranti	90	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	50047
Shorea	parvijolia	Red Meranti	90 0b	Forest Research Institute Malaysia	Sebeb Melowie	50048 Tc0005
Shorea	parvijolia	Red Maranti	90 7h	Domingo trail Deremakot EP	Sabah, Malaysia	Tc000.4
Shorea	parvistipulata	Red Maranti	70 7h	Plat Deremaket forest researce	Sabah, Malaysia	Te1526
Shorea	parvisupulula	Red Moranti	70 7h	I ambir Hills National Dark	Sabali, Walaysia	20.1
Shorea	pauciflora	Red Meranti	70 7h	Lambir Hills National Park	Salawak, Malaysia	30-1
Shorea	pauciflora	Red Meranti	70 7h	Georg August University of Goettingen	Indonesia	spe0308
Shorea	pauciflora	Red Meranti	70 7h	Forest Research Centre arboretum	Sabah Malaysia	Tc0010
Shorea	nilosa	Red Meranti	8	I ambir Hills National Park	Sarawak Malaysia	31-1
Shorea	nilosa	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia Sarawak, Malaysia	31-2
Shorea	nilosa	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia Sarawak, Malaysia	31-3
Shorea	ninanga	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular Malaysia	3415
Shorea	nlatvclados	Red Meranti	7h	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia Kalimantan	137
Shorea	platyclados	Red Meranti	7b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	138
Shorea	platyclados	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1074
Shorea	nlatvcarna	Red Meranti	9b	Sungai Karang	Peninsular Malaysia	136
Shorea	pubistyla	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	3437
Shorea	auadrinervis	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malavsia	32-1
Shorea	auadrinervis	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	32-2
Shorea	auadrinervis	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	32-3
Shorea	rubra	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malavsia	33-1
Shorea	rubra	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malavsia	33-2
Shorea	rubra	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malavsia	33-3
Shorea	rugosa	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	3425
Shorea	scaberrima	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Sarawak, Malavsia	384
Shorea	singkawang	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0040
Shorea	singkawang	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0041
Shorea	singkawang	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0044
Shorea	slootenii	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	34-1
Shorea	slootenii	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	34-2

# 表 6-1 (続き)

			表 6-1	(続き)		
Shorea	slootenii	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	34-3
Shorea	smithiana	Red Meranti	7a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	35-1
Shorea	smithiana	Red Meranti	7a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	35-2
Shorea	smithiana	Red Meranti	7a 7-	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	35-3
Shorea	smithiana	Red Meranti	/a 7a	Forest Research Centre arboretum	Indonesia Sabah Malaysia	spe0149
Shorea	smithiana	Red Meranti	7a 7a	Plot Deramakot forest researve	Sabah Malaysia	Ts1460
Shorea	smithiana	Red Meranti	7a 7a	Plot Deramakot forest researve	Sabah Malaysia	Ts1506
Shorea	smithiana	Red Meranti	7a	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia. Kalimantan	248
Shorea	smithiana	Red Meranti	7a	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	249
Shorea	splendida	Red Meranti	8	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0061
Shorea	splendida	Red Meranti	8	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0959
Shorea	stenoptera	Red Meranti	8	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0082
Shorea	stenoptera	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia	208
Shorea	stenoptera	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia	209
Shorea	stenoptera	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0008
Shorea	stenoptera	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0009
Shorea	stenoptera	Red Meranti	8 015	Forest Research Institute Malaysia	Indonesia	S0010
Shorea	agamii	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak Malaysia	2 1
Shorea	agamii	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	2-1
Shorea	assamica	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular Malaysia	S0027
Shorea	assamica	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular Malaysia	S0027
Shorea	assamica	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0029
Shorea	bracteolata	White Meranti	5	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1299
Shorea	bracteolata	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	217
Shorea	confusa	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	9-1
Shorea	confusa	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	9-2
Shorea	confusa	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	9-3
Shorea	henryana	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	206
Shorea	javanica	White Meranti	5	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1339
Shorea	ochracea	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	26-1
Shorea	ochracea	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	26-2
Shorea	ochracea	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	3433
Shorea	resinosa	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	258
Shorea	roxburghii	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0017
Shorea	roxburghii	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	S0018 S0010
Shorea	roxburghii	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peningular Malaysia	310
Shorea	symingtonii	White Meranti	5	Domingo trail Deramakot FR	Sabah Malaysia	T_000E
Shorea	virescens	White Meranti	5	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia Kalimantan	130001
Shorea	virescens	White Meranti	5	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	127
Shorea	acuminatissima	Yellow Meranti	4b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	142
Shorea	acuminatissima	Yellow Meranti	4b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	143
Shorea	acuminatissima	Yellow Meranti	4b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0071
Shorea	acuminatissima	Yellow Meranti	4b	Domingo trail, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia	Ts000B
Shorea	faguetiana	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	14-1
Shorea	faguetiana	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	14-2
Shorea	faguetiana	Yellow Meranti	4b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1317
Shorea	faguetioides	Yellow Meranti	4b	Plot, Deramakot forest researve	Sabah, Malaysia	Ts0679
Shorea	gibbosa	Yellow Meranti	4b	Plot, Deramakot forest researve	Sabah, Malaysia	Ts1553
Shorea	longiflora	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	22-1
Shorea	longijiora	Yellow Meranti	40 41	Lamoir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	22-2
Shorea	iongisperma maxima	Vellow Meranti	40 4b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	230 \$0022
Shorea	maxima	Vellow Meranti	40 4b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular Malaysia	S0022
Shorea	muinna	Yellow Meranti	46 4h	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe0258
Shorea	natoiensis	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak Malaysia	29-1
Shorea	patoiensis	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	29-2
Shorea	patoiensis	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	29-3
Shorea	patoiensis	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	29-4
Shorea	peltata	Yellow Meranti	4b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia	spe1033
Shorea	xanthophylla	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia	37-2
Нореа	dryobalanoides			Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	H0010
Нореа	mengarawan			Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	H0044
Нореа	mengarawan			PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	146
Hopea	mengarawan			PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	147
Neobalanocarpus	heimii	-		Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	N0001
Vatica	bella	Out group		Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia	Vat1
Vatica	oblongifolia	Out group		P1 Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan	228
Anisoptera	laevis	Out group		Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia	A0007
Coryrelobium	инсеонинт	Out group		rorest Research institute Malaysia arboretum	r emmsular, Malaysia	C0001

#### \*Ashton (1982)

Region	Names of primers	Sequences (5'->3')		Length (bp)
trnL(UAA) intron	cp2F	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al.(1991)	506
	cp2R	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet et al.(1991)	
trnL(UAA)-trnF(GAA)	cp3F	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	Taberlet et al.(1991)	441
	cp3R	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet et al.(1991)	
trnH(GUG)-psbA-trnK(UUU)	cp5F	ACGGGAATTGAACCCGCGCA	Demesure et al.(1995)	1780
	cp5R	CCGACTAGTTCCGGGTTCGA	Demesure et al.(1995)	
	cp5iF1	TTTTCTGTGGTTTCCCTGAT		_
	cp5iF2	GCRATGAAGGCRATAATAAA		
	cp5iR1	TGCTCAYAACTTCCCTCTA		
	cp5iR2	TCCCTATTCAGTGCTATGC		
	cp5iR3	CCGCAACTTCTGTATTTATT		
psbC-trnS(UGA)	cp6F	GGTCGTGACCAAGAAACCAC	Demesure et al.(1995)	1559
	cp6R	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC	Demesure et al.(1995)	_
	cp6iF1	TGGAGGAGAAGGATGGATTG		
	cp6iF2	GCCACCTCTCATTTTGTTCT		
	cp6iR1	ACACTCACAATCCATCCTTC		
	cp6iR2	CCCAGAACAAAATGAGAGGT		
Primers for amplification of small f	fragment for plywood			Length (bp)
trnL(UAA) intron	2AF	CGAAATCGGTAGACGCTACG		
	2AR	GAATAGGTGTCCCAGTCGTT		306
	2BF	ACTGGGACACCTATTCTT		
	2BR	CTATCTTTATTCTCGTCCAA		190
	2CF	AATGGATTAATTGGACGAGAA		
	2CR	GGGGATAGAGGGACTTGAAC		129

# 表 6-2 解析した葉緑体 DNA の領域とそれらのプライマー塩基配列

Lengths include alignment gaps.

# ウ 結果

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。また合計の塩基配列長はギャップを含んで 4286bp であった。これらの塩基情報は日本 DNA データバンク(DDBJ)に登録した。種を識別する多型サイトはイ エローメランティの 17 サイトからレッドメランティの 128 サイトの範囲で塩基配列が長くなるほど多型サイト が多くなる傾向があった(表 6-3)。各材色グループ内での塩基多様度はホワイトメランティで最も高く、イ エローメランティが最も低かった(表 6-4)。

表 6-3 材グループ内の種識別のための多型サイト

Group	trnL	<i>trn</i> L- <i>trn</i> F	trnH-psbA-trn	K psbC-trnS	Total							
	506 bp	441 bp	1780 bp	1559 bp								
White meranti	11 (4, 7)	14 (0, 14)	42 (7, 35)	39 (4, 35)	106 (15, 91)							
Yellow meranti	3 (2, 1)	4 (1, 3)	5 (3, 2)	5 (4, 1)	17 (10, 7)							
Balau	7 (2, 5)	18 (6. 12)	35 (24, 11)	41 (12, 29)	101 (44, 57)							
Red meranti	11 (7, 4)	26 (9, 17)	48 (27, 21)	43 (30, 13)	128 (73, 55)							
表 6-4 4 つの材のグループにおける葉緑体 DNA 領域の塩基多様度												
Group	trnL (S.D.)	trnL-tr	<i>n</i> F (S.D.)	trnH-psbA-trnK (S.D	D.) psbC-trnS (S.D.)							
White meranti	0.00468 (0.00098)	0.01043	3 (0.00194)	0.00679 (0.00148	B) 0.00555 (0.00161)							
Yellow meranti	0.00075 (0.00030)	0.00164	4 (0.00039)	0.00060 (0.00013	b) 0.00037 (0.00022)	ļ						
Balau	0.00176 (0.00050)	0.00674	4 (0.00097)	0.00282 (0.00050	0.00418 (0.00048)	)						
Red meranti	0.00149 (0.00019)	0.00515	5 (0.00052)	0.00142 (0.00024	) 0.00129 (0.00027)	)						

系統解析の結果、材色での4グループは S. roxburghiiを除いて単系統であることが支持された(図 6-1 a)。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 6-5)。また 4 つの材色のグループの分岐はそれぞれ 99, 61, 64 のブートストラップ値を示した。

Group		tr	nL(b	p)			<i>trn</i> L <i>-trn</i> F (bp)							tı	mH-ps	sbA <b>-</b> tr	nK (b	p)
	190	214	285	296	358	17	52	203	220	245	269	300	92	637	1416	1509	1532	1681
White meranti	С	Т	Т	Т	Т	G	С	Α	С	Т	С	С	С	Α	С	G	С	Т
Yellow meranti	Т	G	С	G	Т	G	С	G	Т	G	G	Т	Т	G	Α	G	Α	Т
Balau	С	Т	С	Т	Α	G	Т	G	С	Т	С	Т	Т	G	С	Т	С	Т
Red meranti	С	Т	С	Т	Т	Α	С	G	С	Т	С	Т	Т	G	С	G	С	С

	4 つの材のグループ間の識別塩	基置推	寏
--	-----------------	-----	---

Group	psbC-trnS (bp)													
-	74	109	484	526	637	655	709	766	1139	1378	1394	1414	1445	1553
White meranti	С	С	С	G	Т	G	С	Т	А	Α	Т	А	С	G
Yellow meranti	Т	С	С	Α	Т	Т	Т	Т	Α	Т	Т	А	Т	Α
Balau	С	С	Т	А	С	Т	Т	С	Α	Т	Т	G	С	G
Red meranti	С	Т	Т	Α	Т	Т	Т	Т	Т	Т	С	Α	С	G

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(図 6-1 b、c)。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。また異なるセクションに属する種が同一の塩基配列をもつものもあった((i) *S. smithiana* (MS3), *S. slootenii* (MW3), *S. leprosula* (MP3) and *S. fallax* (MW1) (ii) *S. smithiana* (MS1), *S. leprosula* (MS1), *S. fallax* (MW1), *S. bullata* (MW), *S. leprosula* (MP3), *S. platyclados* (I), and *S. smithiana* (MS2).)。これらの種は 2 つのセクション Brachypterae と Mutica に属し、両セクションともレッドメランティで あった。

多く種の種内で複数の葉緑体ハプロタイプが見られた。いくつかの種は他種と葉緑体ハプロタイプを共 有していたが、その中でもレッドメランティに属するものはその関係が複雑であった。しかし、葉緑体ハプロ タイプは材の識別グループを越えて共有することはなかった。

調査した塩基配列で *S. albida* と他の *Shorea* 種を識別する 2 つの塩基が見つかった(*trn*H-*psb*A-*trn*K の 11 番目と 1225 番目の塩基)。

#### エ 考察

この研究では葉緑体 DNA の 4.2kb の塩基配列を解析したが、いくつかの種で同じ塩基配列を共有す る種が存在し全ての種を識別するには至らなかった。これら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 (Internal transcribed spacer)などの領域を調査する必要が ある。

得られたデータセットで材色を識別する多くの塩基置換が見つかった。これらを特異的に増幅する例えば対立遺伝子特異的 PCR(Vallone, 1986)などを行うことにより、簡便な識別マーカーの開発が可能になる。

本研究では関税上の問題となっていた S. albida を他の Shorea の種と識別することができた。これらの 情報は材の輸入の違法申請を防ぐための有力な抑止力として効果が期待される。

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。



図 6-1 4 つの葉緑体 DNA 領域の塩基配列データをもとにした Shorea 属の種の系統樹

a:系統樹の概要、b:レッドメランティーグループ、c:バラウ、ホワイト、イエローメランティーグループ。括弧内の 文字は種の産地を示す(MP:マレー半島、MW:サラワク州、MS:サバ州、I:インドネシア)、また数字は同じ産地 で複数個体を分析した場合は分析個体番号を示してある。系統樹の分岐の上下の数字は50%以上のブートス トラップ確率だけを示してある。

I Shorea acuta (MW3) Shorea f erruginea (MW1) Shorea ov alis (I 1) Shorea macroptera ssp. macropterifoli... Shorea tey smanniana (I) Shorea slootenii (MW1) 85 Shorea macroptera ssp. macropterifoli (2) Shorea macroptera ssp. baillonii (MW1) Shorea ferruginea (MW2) 56 Shorea acuta (MW4) Shorea acuta (MW2) Shorea acuta (MW1) Shorea macroptera ssp. sandakanensis ((2) Shorea macroptera (MS1) Shorea macroptera (MP2) Shorea macroptera (MP1) horea macroptera (MP4) Shorea acuminata (I 1) Shorea argentif olia (MW) Shorea virescens (MP1) Shorea virescens (MP2) Shorea acuminata (MP1) Shorea acuminata (MP2) Shorea acuminata (MP3) - Shorea andulensis (I) Shorea pauciflora (I 1) Shorea platiclados (MP2) Shorea pubisty la (MP) Shorea platiclados (MP1) Shorea palosapis (MP) Shorea falcifera (MP) Shorea dasy phy lla (MP) Shorea scaberrima (MP) Shorea dasy phy lla (I) Shorea parv if olia (MP1) Shorea parv if olia (MP2) Shorea parv if olia (MS1) Shorea parv if olia (MW1) Shorea parv if olia (MW3) Shorea quadrinerv is (MW1) Shorea quadrinerv is (MW2) Shorea rubra (MW1) Shorea rubra (MW2) - Shorea parv if olia (MW2) Shorea rubra (MW3)

# Ш

Shorea singkawang (MP3) Shorea slootenii (MW2) 67 Shorea singkawang (MP2) Shorea singkawang (MP1) Shorea mecistoptery x (MS1) 67 Shorea mecistoptery x (MS2) Shorea ov ata Shorea leprosula (I 1) 91 - Shorea ov alis (MP2) Shorea ov alis (MP1) Shorea smithiana (MS3) Shorea slootenii (MW3) Shorea leprosula (MP4) Shorea fallax (MW1) 83 Shorea curtisii (MS2) Shorea curtisii (MW1) Shorea smithiana (MS1) Shorea leprosula (MS1) Shorea fallax (MW1) Shorea bullata (MW) Shorea leprosula (MP3) Shorea platy clados (I) Shorea smithiana (MS2) 98 Shorea fallax (MS1) Shorea smithiana (MW2) - Shorea almon (MW2) Shorea stenoptera (I 1) Shorea splendida (I 2) Shorea splendida (I 1) Shorea pilosa (MW3) Shorea pilosa (MW2) Shorea pilosa (MW1) Shorea amplexicaulis (MW2) Shorea amplexicaulis (MW1) Shorea almon (MW1) Shorea splendida (MP) Shorea pinanga (MP) 79 Shorea macrophy lla (MP1) Shorea macrophy lla (MP2) Shorea stenoptera (MP1) 57 Shorea stenoptera (MP1) Shorea stenoptera (MP2) Shorea stenoptera (MP2) Shorea stenoptera (MP3) Shorea macrophy lla (MW1) Shorea macrophy lla (MW2) 63 Shorea macrophy lla (MW3)

# III

Shorea johorensis (MP) - Shorea johorensis (I 1) 72 Shorea johorensis (MS1) Shorea johorensis (MW1) 54 Shorea johorensis (MW2) 66 Shorea johorensis (MW3) Shorea johorensis (MW4) 56 Shorea kunstleri (MW1) Shorea leprosula (MS2) Shorea quadrinerv is (MW3) Shorea kunstleri (MP1) 85 Shorea kunstleri (MP2) Shorea flav iflora (MP) - Shorea rugosa (MP) Shorea beccariana (MP) Shorea fallax (MP1) Shorea smithiana (MP2) Shorea smithiana (MP1) Shorea fallax (I 1) Shorea fallax (MW2) Shorea parv istipulata (MS1) Shorea smithiana (I 1) Shorea smithiana (MW1) Shorea smithiana (MW1) — Shorea platy carpa (MP) Shorea albida (MW2) 98 Shorea albida (MW3) Shorea albida (MW1) Shorea macroptera ssp. sandakanensis (... 94 Shorea obscura (MP) Shorea almon (MS1) 63 Shorea macroptera ssp. baillonii (MW) Shorea parvistipulata (MS2) 99 Shorea pauciflora (MS1) Shorea pauciflora (MW1) Shorea pauciflora (MW2)

#### b



С

#### オ 今後の問題点

種の識別の効率を上げるためさらに多くの葉緑体 DNA の領域を解析するか、核の遺伝子を調査する 必要がある。

また DNA で地域識別を可能にするために種内の分析個体数を増やし、異なる地域から同種のサンプルを収集する必要がある。

# カ 要約

東南アジアの熱帯林を構成する重要なフタバガキ科 Shorea 属の樹種を識別する DNA データベースの

構築を行った。マレーシア及びインドネシアから Shorea 属 85 種で 202 個体を収集した。収集したサンプ ルから DNA を抽出し、葉緑体 DNA の遺伝子館領域である約 4.2kb を解析した。Shorea 属の材色による 4 つのグループである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、バラウは明瞭に識別され、そ れぞれが単系統であることが支持された。またこれらを識別する多数の塩基配列が見つかった。関税上の 問題となっている S. albida についても他の Shorea 属と識別する 2 つの塩基サイトが見つかった。これらの データベース情報は違法伐採や輸入に係る違法申告を減少させる抑止力として有効に機能することが期 待される。

#### キ 引用文献

- Ashton, P.S. (1982) Flora Malesiana. Series I-Spermatophyta. Flowering Plants Vol.9, part 2, Dipterocarpaceae.Martinun Nijhoff Publishers, The Netherlands.
- Balmford, A., Bennun, L., Brink, B., Cooper, D., Côté, I. M., Crane, P., Dobson, A., Dudley, N., Dutton,
  I., Green, R. E., Gregory, R. D., Harrison, J., Kennedy, E. T., Kremen, C., Leader-Williams,
  N., Lovejoy, T. E., Mace, G., May, R., Mayaux, P., Morling, P., Phillips, J., Redford, K.,
  Ricketts, T. H., Rodríguez, J. P., Sanjayan, M., Schei, P. J., van Jaarsveld, A. S. and Walther,
  B. A. (2005) The convention on biological diversity's 2010 target, Science, 307, 212-213.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, Evolution, **39**, 783-791.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Molecular Biology and Evolution, **4**(4), 406-425.
- 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)
- Vallone, P. M., Just, R. S., Coble, M. D., Butler, J. M. and Parsons, T. J. (2004) A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome, International Journal of Legal Medicine, 118, 147-157.

(森林遺伝研究領域 津村義彦)

「交付金プロジェクト」は、平成13年度に森林総合研究所が独立行政法人となる にあたり、これまで推進してきた農林水産技術会議によるプロジェクト研究(特別研 究など)の一部、および森林総合研究所の経費による特別研究調査費(特定研究)を 統合し、研究所の運営費交付金により運営する新たな行政ニーズへの対応、中期計画 の推進、所の研究基盤高揚のためのプロジェクト研究として設立・運営するものであ る。

この冊子は、交付金プロジェクト研究の終了課題について、研究の成果を研究開発 や、行政等の関係者に総合的且つ体系的に報告することにより、今後の研究と行政の 連携協力に基づいた効率的施策推進等に資することを目的に、「森林総合研究所交付 金プロジェクト研究成果集」として刊行するものである。

