

讨论与建议

基于DNA的木材识别新技术发展与应用

焦立超¹, 殷亚方¹, 孙清鹏², 肖复明³, 姜笑梅¹

(1. 中国林科院木材工业研究所, 北京 100091; 2. 北京农学院生物技术学院, 北京 102206;

3. 江西省林业科学院, 江西南昌 330032)

摘要: 介绍了基于DNA方法的木材识别新技术在国内外的研究进展, 在分析现存技术问题的基础上, 提出完善DNA方法在木材识别领域应用的建议。为开辟木材识别的新途径, 保护木材资源、推进木材合法贸易提供技术支撑。

关键词: 木材解剖; 木材组织; DNA方法; 属; 种

中图分类号: S781.1; TS6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-8654(2012)01-0027-04

Wood Identification Based on Deoxyribonucleic Acid Methods

JIAO Li-chao¹, YIN Ya-fang¹, SUN Qing-peng², XIAO Fu-ming³, JIANG Xiao-mei¹

(1. Research Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. College of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 3. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, Jiangxi, China)

Abstract: The authors introduced the status and application of a newly developed wood identification technology based on deoxyribonucleic acid (DNA). Compared with the traditional wood identification (wood anatomy) method, the DNA method demonstrates potential in species identification which is very difficult to accomplish by using the traditional anatomical technology. The authors also described research progress and technical problems using DNA for wood identification.

Key words: wood anatomy; wood tissue; deoxyribonucleic acid methods; genus; species

随着人们生活水平的提高, 全球对木材资源, 特别是对珍贵树种木材的需求与日俱增; 同时由于利益驱使, 非法采伐和过度采伐, 使得森林资源日趋匮乏, 世界木材市场非法贸易行为时有发生。因此, 为维护消费者合法利益, 规范木材贸易市场, 以及保护生态环境, 对木材进行科学、准确地识别势在必行。

传统的木材识别技术建立在木材解剖学基础上, 主要通过木材宏观和微观特征相结合的方法实现。由于木材自身变异性较大, 其颜色、气味和纹理等宏观特征, 一般仅作为木材识别的辅助参考依据。微观

识别技术是通过制备木材横、径和弦切面的显微切片, 观察和记录各类组织与细胞的形态与排列, 并与正确定名的木材标本切片进行逐项比对, 实现木材的准确识别。该方法涉及的木材识别特征较全面, 极大地提高了识别的准确性, 但操作过程复杂^[1]。而且因为木材是树木的茎干部分, 如果不结合根、叶、花与果实的识别, 一般只能确定属, 很难确定到种^[2]。

近年来, 国外学者对DNA方法在木材识别领域的应用进行了深入地研究^[2], 因为不同种的木材, DNA信息亦不同, 通过区分这些特异性的DNA片段, 进而实现木材的物种鉴定。

目前, DNA条形码(DNA barcoding)及DNA指纹(DNA fingerprinting)等DNA分子遗传方法, 已广泛应用于物种及个体鉴定等领域。其中, DNA条形码是利用一段标准DNA序列作为标记, 实现快

收稿日期: 2011-10-20; 修改日期: 2011-12-07

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目(201104058); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项项目(CAFYBB2011005-2)。

作者简介: 焦立超(1986—), 男, 中国林科院木材工业研究所硕士研究生。

通讯作者: 殷亚方, 男, 中国林科院木材工业研究所研究员。

速、准确和自动化的物种鉴定,其可以作为生物种水平(species-level)的有效鉴定工具^[2]。国际生命条形码工程(International Barcode of Life Project, iBOL)及生命条形码数据库(Barcode of Life Database, BOLD)的建立,加快了 DNA 条形码的应用和发展。

研究表明,利用成熟酶 matK(maturase K)和核酮糖二磷酸羧化酶(ribulose-bisphosphate carboxylase, rbcL)的叶绿体基因位点,可以区分约 70% 的植物物种^[2-3]。而 DNA 指纹则是指具有完全个体特异的 DNA 多态性,其识别原理和手指指纹相似,因此, DNA 指纹标记可以应用于生物个体鉴定^[2]。目前,国外 DNA 指纹技术已经在木材个体识别领域得到了初步应用^[4]。

鉴于此,笔者对基于 DNA 方法的木材识别新技术研究与应用的进展进行总结与分析,并开展相关研究,旨在为木材识别的技术开发、保护木材资源、推进木材合法贸易提供技术支撑。

1 国内外研究进展

1.1 国外研究进展

1.1.1 DNA 提取

1) 新鲜树木组织

国外关于植物 DNA 提取的研究始于 20 世纪 80 年代初。研究者采用十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide, CTAB)法,从植物新鲜叶片中,成功提取了高分子量(5000 bps)DNA^[5];随后,又对新鲜叶片组织 DNA 的快速提取方法进行了完善^[6]。

近年来,科研人员对从树木新鲜叶片及嫩芽组织中提取 DNA,进行了深入研究^[7-11],如从欧洲红豆杉(*Taxus baccata*)^[8]和象牙海岸崖木(*Erythrophloeum ivorense*)等树种的新鲜叶片,以及栎属(*Quercus* spp.)树木的嫩芽中,均提取出了高质量的 DNA^[10-11]。

从木材组织中获取高质量 DNA,是开展 DNA 木材识别技术的重要前提。90 年代初开始了从树木新鲜木材组织中提取 DNA 的研究。与树木新鲜叶片及嫩芽组织相比,从新鲜木材组织中提取 DNA 更困难。但已经有学者成功从刺槐(*Robinia pseudoacacia*)、栎属(*Quercus* spp.)以及龙脑香科(Dipterocarpaceae)等树种的新鲜木材组织中,获得

高质量的 DNA^[12-15]。

2) 干燥处理后的木材组织

尽管从树木新鲜组织中能够获取高质量的 DNA,但在生产贸易中,需识别的对象大多是干燥加工过的木材样品。因此,探究从干燥后的木材组织中获取高质量 DNA,并对其进行分析,更具有实用性。

研究表明,相比新鲜木材,从干燥木材组织中提取 DNA 更复杂。原因是受干燥过程中高温、存储时间等因素影响,木材组织的 DNA 普遍严重降解^[16]。

但近 10 年来,国外研究者从干燥后的木材中,提取 DNA 的技术已有突破,并初步编制了实施方案^[17-19]。如从不同存储时间与热处理后的新棒果香(*Neobalanocarpus heimii*)木材中^[20],以及锯材和贴面板等木制品中,均成功提取出 DNA^[21]。

从干燥的木材组织中提取 DNA 的技术尚处于摸索阶段,多采用 DNA 提取试剂盒法(DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN)^[17,22-24],并对 QIAGEN 试剂盒法不断改进,从而获取高质量的 DNA^[18]。

研究人员分别采用 CTAB、QIAGEN 试剂盒,以及 PTB 试剂法(N-phenacylthiazolium bromide, C₁₁H₁₀BrNOS)3 种方法,进行濒危树种邦卡棱柱木(*Gonystylus bancanus*)加工后试样 DNA 的提取。结果表明,CTAB 法和 QIAGEN 试剂盒法提取的 DNA 数量和质量均较低;而样品经 PTB 试剂处理后,提取的 DNA 纯度和数量均较高^[19]。提取新棒果香 DNA 的试验结果也证明,PTB 法大大提高了加工后木材 DNA 提取的成功率^[20]。

从干燥木材的边材、边心材过渡区及心材等不同区域提取 DNA,并对其含量进行分析,对提高 DNA 的提取质量具有指导意义^[13,17,20,22,24]。边材 DNA 含量一般高于心材^[13],荧光显微分析表明,边材 DNA 主要来自细胞核和质体等细胞器;而心材 DNA 则来自射线细胞中的质体。边材中晚材射线薄壁细胞的 DNA 含量高于早材^[24]。

1.1.2 DNA 目的片段扩增及产物纯化

聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术,目前已广泛应用于基因分离、基因检测、克隆和核酸序列分析等研究领域。PCR 扩增技术可以在短时间内获得大量的特定基因片段。然而,木材组织中存在

大量的抑制扩增的酚、多糖等代谢物^[25],严重影响其PCR扩增成功率。

研究表明,DNA片段大小、干燥程度、储存时间和不同位置的木材组织等,均是影响PCR扩增的重要因子^[13]。DNA片段短,加工程度低以及储存期较短的试样,扩增成功率较高;边材DNA扩增成功率,较边心材过渡区和心材高。但由于边材含有较多PCR抑制物质,需要向裂解液中加入聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone,PVP),以提高扩增成功率。

通常选取叶绿体DNA(cpDNA)、线粒体DNA(mtDNA)和核糖体DNA(rDNA)的目的片段,进行PCR扩增^[17,22-24]。目前已成功扩增了栎属树种木材的叶绿体、线粒体和核糖体的目的基因片段^[17],以及北美红杉(*Sequoia sempervirens*)、北美乔柏(*Thuja plicata*),以及智利柏(*Fitzroya cupressoides*)干燥枝条的细胞核rDNA内转录间隔区(ITS)目的片段^[23]。此外,也成功扩增新棒果香和日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)等木材的DNA目的片段^[20,24]。

扩增后的目的产物可以通过PCR产物纯化试剂盒,如MinElute PCR Purification Kit^[18,20],或Wizard®离空凝胶和PCR纯化系统(Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System)^[24]进行纯化,以去除PCR反应产物中残存的核苷酸、酶、矿物油和其他DNA样品杂质,并收集其中的DNA目的片段,为测序提供较高纯度的扩增产物。

1.1.3 DNA目的基因测序及序列比对

对纯化后的木材组织DNA扩增目的产物进行基因测序,然后将测得的序列与基因数据库,如美国国立生物技术信息中心(The National Center for Biotechnology Information,NCBI)等公布的序列进行比对,以确定木材树种。

目前,已完成杉木(*Cunninghamia lanceolata*)、白蜡树(*Fraxinus excelsior*)和楸树(*Catalpa bungei*)等树种叶绿体DNA目的片段的测序工作,进一步证实了DNA方法在木材识别方面的可行性^[22];此外通过对PCR目的产物的测序,从3种形态相似的树种中,成功鉴别出智利柏^[23]。

1.2 国内研究进展

与国外研究相比,我国基于DNA方法的木材识别技术研究起步较晚。近年来,虽然开展了植物

DNA的提取及分析工作,但研究主要集中在新鲜叶片及嫩芽组织DNA的提取、扩增及分析阶段。通过对rDNA的ITS序列扩增,并将所得序列在NCBI数据库中比对,已成功鉴定红豆杉属(*Taxus* spp.)树种^[26]。然而,国内对从木材组织中提取DNA,并进行序列分析的相关研究,还未见报道。

最近,笔者分别采用CTAB和QIAGEN试剂盒方法,从低温储藏及高温干燥等不同处理条件下,杉木(陈山红心杉)的边材、边心材过渡区,及心材区域的木材组织中,提取到了较高质量的DNA,并成功实现了DNA目的片段的PCR扩增。

2 存在问题及应对措施

2.1 存在问题

2.1.1 影响DNA有效提取的因素

1) 物理因素 木材是一种较坚硬的植物组织,为了使木材组织中的木纤维、导管及薄壁细胞等细胞破裂,通常采用钻、切片和研磨等机械加工方法产生的热量,会使试样的DNA片段发生降解。

2) 化学成分 木材中含有某些化合物,干扰DNA的提取质量,影响DNA目的片段的PCR扩增。

3) 生物因素 附着在木材上的真菌及微生物会分解木材,进而使木材DNA降解;同时,长期储存的木材表面,亦会被外界微生物的DNA所污染。

4) 存储时间 树木被采伐以后,随着植物细胞的死亡及存储时间的延长,DNA逐渐降解^[13]。

5) 加工程度 木材经过高温干燥等处理后,DNA降解很严重,影响DNA的提取与分析。

2.1.2 DNA方法的应用

1) 在木材识别领域,木材DNA的有效提取及序列分析方法、技术尚未成熟。同时,不同地域的种内序列可能存在差异,且未建立一种可跨越不同地域、并能适应所有树种木材DNA识别的国际基因参照标准,这些因素均制约了DNA方法的广泛应用。

2) 目前公开发布的基因数据库,如NCBI中,物种基因序列还不完备。建立一套完整可靠的木材DNA信息数据库系统,工作量庞大,技术难度高,尚存在大量技术细节需要解决。

2.2 应对措施

1) 在样品制备过程中,将木材组织控制在低温

状态,如加入液氮,尽量避免 DNA 的进一步降解。

2) 通过向 DNA 提取液中加入有效去除多酚、多糖、蛋白等物质的试剂,如 PVP 和 PTB 等,以减少木材组织中的化合物对 DNA 目的片段 PCR 扩增的干扰,提高 PCR 扩增成功率。

3) 通过改进和完善现有 DNA 提取方法,提高从长期储存或已降解木材组织中提取 DNA 的质量。

4) 加强全球木材识别相关研究领域的技术合作,共同建立能满足绝大多数树种的国际基因参照标准和木材 DNA 信息数据库,加快推进木材 DNA 识别新技术的实际应用。

3 前景与展望

1) 木材 DNA 方法作为一种新的木材识别技术,是实现木材种的识别的技术基础,必将为现有木材识别技术开辟新的途径。

2) 建立木材 DNA 信息数据库,适应绝大多数树种的基因参照标准,是木材 DNA 方法能够广泛和准确应用的技术关键。木材 DNA 信息数据库及相应基因参照标准的建立,需要各国科学工作者继续开展大量的科学试验,并对研究数据进行分析与整合。

3) 木材 DNA 识别技术的开发和储备,将会为木材贸易执法和监管提供技术支持。

4) 通过传统木材解剖识别技术与木材 DNA 识别技术的结合,实现木材树种的科学准确识别。

参考文献:

- [1] 姜笑梅,殷亚方,刘波. 木材树种识别技术现状、发展与展望[J]. 木材工业,2010,24(4): 36-39.
- [2] Lowe A J, Cross H B. The application of DNA methods to timber tracking and origin verification[J]. IAWA Journal,2011, 32(2): 251-262.
- [3] Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. Proc Natl Acad Sci,2009,106(31): 12794-12797.
- [4] Lowe A J, Wong Y S, Tiong S, et al. A DNA method to verify the integrity of timber supply chains; confirming the legal sourcing of merbau timber from logging concession to sawmill [J]. Silvae Genet,2010,59(6):263-268.
- [5] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research,1980,8(19): 4321-4326.
- [6] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin,1987, 19(1): 11-15.
- [7] Quinsavi C, Sokpon N, Khasa D P. Genetic Diversity and Population Structure of a Threatened African Tree Species, *Milicia excelsa*, Using Nuclear Microsatellites DNA Markers[J]. International Journal of Forestry Research,2009: 1-8.
- [8] Barzegari A, Vahed S Z, Atashpaz S, et al. Rapid and simple methodology for isolation of high quality genomic DNA from coniferous tissues (*Taxus baccata*) [J]. Mol Biol Rep,2010, 37 (2): 833-837.
- [9] Dumilil J, Heuertz M, Doucet L, et al. CpDNA-based species identification and phylogeography: application to African tropical tree species[J]. Molecular Ecology,2010,19(24): 5469-5483.
- [10] Toader V A, Moldovan I C, Sofletea N, et al. DNA isolation and amplification in oak species (*Quercus* spp.) [J]. Bulletin of the Transilvania University of Brasov,2009,51(2): 45-50.
- [11] Dumolin S, Demesure B, Petit R J. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method[J]. Theor Appl Genet,1995,91(8): 1253-1256.
- [12] De Filippis L, Magel E. Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in Robinia trees using RAPD-PCR[J]. Trees,1998,12(6): 377-384.
- [13] Rachmayanti Y, Leinemann L, Gailing O, et al. DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success [J]. Forensic Science International: Genetics, 2009,3(3):185-192.
- [14] Dumolin-Lapègue S, Pemonge M H, Gielly L, et al. Amplification of oak DNA from ancient and modern wood [J]. Molecular Ecology,1999,8(12): 2137-2140.
- [15] White E, Hunter J, Dubetz C, et al. Microsatellites markers for individual tree genotyping: application in forest crime prosecutions[J]. J Chem Technol Biotechnol,2000,75(10): 923-926.
- [16] Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2010,85(5): 1251-1258.
- [17] Deguilloux M, Pemonge M, Petit R. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA [J]. The Royal Society,2002,269(1495): 1039-1046.
- [18] Rachmayanti Y, Leinemann L, Gailing O, et al. Extraction, amplification and characterization of wood DNA from Dipterocarpaceae [J]. International Society for Plant Molecular Biology,2006,24(1): 45-55.
- [19] Asif M J, Cannon C H. DNA Extraction From Processed Wood: A Case Study for the Identification of an Endangered Timber Species (*Gonystylus bancanus*) [J]. Plant Molecular Biology Reporter,2005,23(2): 185-192.
- [20] Tnah L H, Lee S L, Ng K K S, et al. DNA extraction from dry wood of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae) for forensic DNA profiling and timber tracking [J]. Wood Sci Technol,2011.

(下转第 38 页)

企业供暖等,避免因直接排放,造成水源及其热能的浪费及热能损失。

3.2 泄露热能利用

1) 在单板干燥机进出口处安装密封刷,以提高系统的密闭性;

2) 通过改善工艺衔接环节的密封性,选用节能型疏水阀,如将热动力式疏水阀,更换成浮球式疏水阀,可有效减少泄漏造成的热能损失。

3.3 供热热能利用

1) 以热油替代蒸汽作为热源^[10],形成循环系统,避免出现蒸汽热源的闪蒸蒸汽造成的热损失。

2) 国内外很多家具及人造板生产企业,利用树皮、锯屑、木粉、刨花等木材加工剩余物,作为燃料。对燃料燃烧生成烟气,进行除尘净化后,依据单板干燥要求进行配气,直接送至干燥机。同时,利用烟气作为热源,可避免蒸汽锅炉与导热油炉的间接换热造成的热量损失。

参考文献:

[1] 2011 年中国林业发展报告[EB/OL]. [2011-11-29]. <http://www.forestry.gov.cn/portal/main/s/52/content-510360.html>.

- [2] 梁关明,叶航,忻强. 改善单板干燥机热能利用的途径[J]. 林业劳动安全,1999(1):33-34.
- [3] 许美琪. 单板干燥机排气管开启度对能耗的影响[J]. 林产工业,1988,(5).
- [4] 周平. 提高单板干燥机效率降低能耗的刍议:进口单板辊筒干燥机剖析[J]. 木材工业,1995,9(5):33-36.
- [5] 孙建树,史铁槐,董桂芝. 提高 MZ2128 型网带式单板干燥机效率的有效措施[J]. 林产工业,1997,24(3):35-39.
- [6] 常健民,徐瑞玉. 单板干燥机的热能利用分析[J]. 东北林业大学学报,1990,18(4):74-79.
- [7] William T Simpson. Dry Kiln Operator's Manual[M]. Madison: U S Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, 1991.
- [8] Diego Elustondo, Luiz Oliveira. Opportunities to Reduce Energy Consumption in Softwood Lumber Drying [J]. Drying Technology, 2006, 24: 653 - 662.
- [9] 王进武,陈岳仑. 木材干燥窑蒸汽供热系统能量利用分析与节能[J]. 木材工业,1998,12(3):25-27.
- [10] 葛尽,曲雪岩. 高温导热油炉在木材单板干燥中的应用[J]. 林业科技,2004,29(4):36-37.

(责任编辑 张一萍、姜征)

(上接第 30 页)

- [21] Tsumura Y, Kado T, Yoshida K, et al. Molecular database for classifying Shorea species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products[J]. J Plant Res, 2011, 124(1): 35-48.
- [22] Tang X, Zhao G, Ping L. Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA[J]. Plant Mol Biol, 2011, 77(6): 609-617.
- [23] Hanssen F, Wischniewski N, Moreth U, et al. Molecular identification of Fitzroya cupressoides, Sequoia sempervirens, and Thuja plicata wood using taxon-specific rDNA-ITS primers[J]. IAWA J, 2011, 32(2): 273-284.
- [24] Abe H, Watanabe U, Yoshida K, et al. Changes in organelle and DNA quality, quantity, and distribution in the wood of Cryptomeria japonica over long-term storage[J]. IAWA J, 2011, 32(2): 263-272.
- [25] Lee A B, Cooper T A. Improved direct PCR screen for bacterial colonies: wooden toothpicks inhibit PCR amplification [J]. Biotechniques, 1995, 18(2): 225 - 226.
- [26] 蒋敏捷,高必达. 通过 DNA 检验鉴定植物种属 1 例[J]. 中国司法鉴定, 2011(3): 105-107.

(责任编辑 张一萍、姜征)

行业简讯

全国木材加工技术与装备 发展研讨会在粤举行

2011 年 12 月,由中国林业机械协会与国家林业局北京林业机械研究所共同主办的“2011 全国木材加工技术与装备发展研讨会”,在广东顺德隆重举行。本次会议主题为:加快转变木工机械行业发展方式,努力发展数控及自动化木材加工新装备。

围绕会议主题,北京林业大学、东北林业大学、南京林业大学的专家学者进行演讲;伦敦木工机械商会、山东百圣源集团、石家庄开发区纪元电器、南京新方达数控有限公司等企业,进行技术创新成果交流。

来自全国木材加工机械行业的专家学者、企业管理、工程技术人员等 200 余人到会。会议期间,代表们参观了“第十二届中国(伦敦)木工机械新产品博览会”、“中国木工机械重镇”授牌仪式、“伦敦木工机械”集体商标起用仪式,及当地 2 家装备制造企业。

本刊讯