

讨论与建议

DNA 技术在木材来源鉴定中的应用

张 蓉¹, 殷亚方², 徐魁梧¹, 叶克林²

(1. 南京林业大学材料科学与工程学院, 江苏南京 210037; 2. 中国林科院木材工业研究所, 北京 100091)

摘要: DNA 技术在木材树种鉴别和产地鉴定方面具有较高的准确性, 可用于提高木材合法性检验的可信度和木制品产销链跟踪, 具有国际通用性和可行性。然而由于 DNA 技术特点和木材特性, 其实际应用尚有一定难度。未来还需加大投资和研发力度, 尽快建立公共数据库, 发挥其在合法木材贸易中的重要作用。

关键词: DNA 技术; DNA 条形码; 分子标记图谱; 树种鉴别; 产地跟踪

中图分类号: S781 文献标识码: B 文章编号: 1001-8654(2015)03-0031-04

Application of DNA Technology for Wood Origin Identification

ZHANG Rong¹, YIN Ya-fang², XU Kui-wu¹, YE Ke-lin²

(1. College of Materials Science and Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Research Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Wood identification and origin tracking based on DNA is very accurate. It can be used to increase credibility for legal timber verification and for Chain of Custody (CoC) tracking which is universally recognized internationally. However, practical application of DNA technology is still limited due to limitations with both DNA technology and wood itself. The authors suggest increasing both investment and research to establish a public database to improve the use of this technology in the legal timber trade.

Key words: DNA technology; DNA barcode; molecule marker; species identification; timber origin

随着木材消费量日益增长, 国际木材贸易迅速发展, 受利益驱动的木材非法采伐和贸易也随之猖獗, 给林业监管和生态环境带来压力。对此, 国际上相继颁布了多项法律法规, 例如:《濒危野生动植物种国际贸易公约》(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora,

CITES)、美国雷西法案(Leacy Act Amendment)、欧盟木材法规(European Union Timber Regulation, EUTR)、澳大利亚非法采伐禁止法案(Illegal Logging Prohibition Amendment Regulation, ILPAR)以及荷兰严惩非法木材贸易的法规等, 以确保木材来源合法性。DNA 技术可用于木材贸易中树种鉴别、产地鉴定以及产销链的跟踪, 为木材合法性验证提供一定的技术保障。

1 DNA 技术简介

应用 DNA 技术进行木材树种鉴别和产地鉴定, 主要是依据 DNA 在树种以及产地之间的变异、群体

收稿日期: 2014-12-25; 修改日期: 2015-02-10

基金项目: 林业公益性行业科研专项“濒危和珍贵热带木材识别及其新技术研究”(201304508); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 国家特色学科建设项目; 江苏省“林业资源高效加工利用协同创新中心”项目。

作者简介: 张蓉(1985—), 女, 南京林业大学材料科学与工程学院博士研究生。

责任作者: 叶克林, 男, 中国林科院木材工业研究所所长, 研究员。

遗传关系,采用 DNA 条形码(DNA barcode)、分子标记图谱(Molecule marker)^[1],通过对比已知原产地的木材信息与未知木材的 DNA 变异、基因型差异,确定未知木材的树种和原产地。

1.1 DNA 条形码

DNA 条形码即基因组中特定的 DNA 片段序列信息,具有如下特征:

- 1) 广泛存在于不同树种中,同树种内变异小,不同树种间变异大;
- 2) 易于提取,变异区两端序列高度保守,在众多物种中设计通用引物;
- 3) 短片段,最好一个反应可以完成测序^[1]。

单个 DNA 条形码对物种的鉴别效果有限,其组合可能更适用于木材鉴别。目前木材 DNA 条形码主要有:

叶绿体基因(Chloroplast DNA, cpDNA) 中的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基基因(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, rbcL);成熟酶 K 蛋白基因(Maturase K protein, matK);转移核糖核酸组氨酸基因(tRNA-His, trnH)与光和体系 II 蛋白基因(photosystem II protein D1, psbA)间隔区序列^[2-3];核糖体 RNA 编码基因(rDNA)内转录间隔(Internal transcribed spacer, ITS)序列^[4-5]。但要完全满足木材鉴别的需要,还需开发更多的通用 DNA 条形码,或针对某树种的专用 DNA 条形码。

中国科学院植物所于 2013 年 12 月开放的“中国珍稀濒危植物鉴定平台(DNA Barcode of Rare and Endangered Plant, BREP)”,采用 rbcL、matK、ITS、假叶绿体开放框架(Hypothetical chloroplast open reading frame 1, ycf1)基因 4 条 DNA 条形码,其中 ycf1 是该平台自主开发的 DNA 条形码。该鉴定平台的参考序列库包含了珍稀濒危植物及同属近缘物种,目前已经有 186 科 2 568 种的 18 732 条序列。

国际生物条形码计划提出了基于基因片段鉴定生物物种的标准及其实施框架,有 25 个国家正在合作建立 DNA 条形码资料库^[6]。基于 DNA 条形码的树种鉴别主要应用于解剖构造相似的树种^[7-9],尚不能大范围地在科、属、种等分类单元的鉴别上发挥作用。

1.2 分子标记图谱

分子标记是指特定物种和个体所显示的 DNA 差异片段的总和。在个体水平上,核苷酸序列具有特异性,分子标记可对个体的变异进行检测,以鉴定特定的基因型^[10],据此建立的标记图谱被称为指纹图谱(Fingerprinting)。

分子标记也是研究林木群体遗传结构的一种方法,依据生物多样性,绘制林木遗传信息地理图,跟踪不同地域树种的 DNA 变异。因此,分子标记可应用于木材产地的鉴定。

目前,以木材为对象的分子标记主要有 2 种:

1) 微卫星 DNA(Microsatellite, MS DNA) 在越南沉香和中国沉香的样本中,这些位点之间具交叉特异性。但由于 DNA 在木质部心边材形成、木材存储以及加工过程中,会发生不同程度的降解^[1, 11],现有技术手段还无法从木材中提取全部位点^[12]。

2) 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP) 在不同树种和不同 DNA 片段中,位点分布和位点数量均不同,为图谱构建提供了依据^[13]。

除 MS 和 SNP 外,还有十几种分子标记方法^[14-15],因此,分子标记图谱在木材产地的鉴定方面,有很大发展空间。

根据分子标记研究结果,目前已经绘出印度尼西亚、马来西亚、新加坡和巴布亚新几内亚特许林的印茄木(*Intsia* spp.)和刚果盆地的大绿柄桑(*Chlorophora excelsa*)、筒状非洲楝(*Entandrophragma cylindricum*)和白梧桐(*Triplochiton scleroxylon*)的基因地图,相比检测特许林样本,检测不同国家木材样本的准确率更高,为木材产地的鉴定提供了依据^[6, 16]。

在技术上,某些树种地图可以辨认出几平方公里区域内的树木,以判别木材是来自特许区域的合法采伐木材,还是从周围地区偷采盗伐的木材。通过相关机构和组织的合作,可以建立包括每一棵树木基因信息的数据库,为科研、森林保护和贸易提供支持^[6]。

2 DNA 技术在木材贸易中的作用

2.1 合法性验证

关于木材合法性,尽管各国的法律法规不尽相同,但都要求树种和产地的来源合法。2012 年,美国

对我国胶合板启动“反倾销、反补贴”调查,其中一个焦点问题就是,中国胶合板产品使用了来自俄罗斯的非法原材料。保障木材合法性已经成为木材及木制品贸易的前提,也是解决法律争端的关键手段。

不同物种甚至同一物种的林木在不同产地,普遍存在 DNA 差异,而且木材携带的 DNA 既不易被清除又较难被伪造,因此,DNA 技术可在木材溯源上发挥重要作用。

1) 木材树种鉴别提升至“种”。

木材树种鉴别主要依据木材解剖构造特征。因同一属内各树种木材之间特征相近,通常只能鉴别到“属”。而利用属内树种间 DNA 的差异,可将鉴别的准确度提升到“种”。

但由于该方面研究时间较短,成果有限,尚未建成包含足够多样本量的数据库,目前利用 DNA 技术进行木材鉴别尚属个例^[8]。

2) 木材产地鉴定细化至“林分”。

依据木材解剖构造几乎无法对木材产地进行鉴定,而依据 DNA 分子标记图谱建立的基因地图,根据木材是否来自受保护的森林,可将多数木材的产地鉴定到“国家”,部分可鉴定到“林分”^[16]。

3) 提高木材合法性可信度。

尽管木材采伐和运输法规制度较完善,由于经济利益的驱使,无序无证采伐尚无法完全禁止,影响了相关贸易文件的可信度。对木材样本进行 DNA 比对,可直接验证不同环节文件所标注的树种和产地是否一致,从而提高贸易文件的可信度。

2.2 木制品产销链跟踪

木材贸易涉及采伐、运输、贸易、加工、包装、销售等多个环节,经手者多,区域跨度大,追溯很难。但不论木材运到何地、形态如何变化,DNA 技术对同一棵树的木材鉴别结果总是一致的。尤其是指纹图谱针对个体设计,更适合于木材产销链的跟踪,有助于快速查证贸易中出现问题的环节。

国际生物多样性组织(Bioversity International)建立了全球木材跟踪网络(Global Timber Tracking Network, GTTN),正在依据 DNA 技术建立木材产品供应链跟踪方法,为产销链认证及其追溯性提供依据,为木材生产国和消费国严格执行遏制木材非法采伐的法规,提供切实有效的工具。

目前 DNA 技术仅在局部地区和产销链的特定环节使用。如在印度尼西亚的 Certisource 公司,已应用 DNA 技术,在同一时间从产销监管链的不同环节取样,进行 DNA 配对,据此验证文件的有效性^[17]。下一步计划将 DNA 分子标记图谱技术推广到认证体系,抽样也将从初级加工工序扩展至成品检验工序^[6,16]。

2.3 实现国际通用

木材合法性贸易是国际性难题,各国开展木材合法性工作的范围和推进程度也不一致,因此市场上还会存在无“身份证”的木材和木制品流通。我国先后同美国和欧盟等开展合作交流,研究认证策略与联合应对机制,并与加蓬、印尼和巴布亚新几内亚等国开展试点^[18],今后 DNA 技术将更多地应用于我国木材和木制品国际贸易。

3 DNA 技术的优势和局限性

3.1 DNA 技术的优势

1) DNA 分析结果具有准确性和一致性。

相对于构造鉴别技术和光谱技术,DNA 技术从遗传角度反映了木材的信息,在树根、树干、树枝等不同生长位置,DNA 序列信息均一致,分析结果准确。

2) 基于 DNA 的木材合法性验证具有可行性。

木材合法性认证所需的 DNA 条形码和分子标记技术已取得一定成果,DNA 分子标记可记录每一个个体的遗传信息。该技术已在农作物、树木和花卉等方面成功应用,为木材树种鉴别提供了借鉴。

3) 分析成本可望降低。

随着 DNA 技术的进步,聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增、产物回收和测序,将成为常规的生物信息学方法,使 DNA 分析的成本降低。

3.2 DNA 技术的局限性

1) DNA 降解,难以提取全部 DNA 信息。

在木材形成、存储和加工过程中,DNA 会发生降解,增加了 DNA 提取的难度,并且影响后续的引物设计和扩增。对中国沉香和越南沉香的 DNA 指纹图谱研究发现,从新鲜叶片中提取到了 5 个 DNA 多态性位点,但只有 1 个位点能从沉香木材 DNA 中扩增出来^[11]。

2) 条形码的有效性和通用性有限,还需与构造鉴别方法相结合。

仅依据某些序列或不同类型的分子标记,在不同物种鉴别中,由于单个序列甚至组合序列的准确率不高^[2-3, 5, 19-20],难以对基因组信息复杂的物种进行鉴别^[21]。为保证木材合法性验证的准确性,还应将DNA技术与构造鉴别技术结合使用。

3) 建立数据库工作量庞大,需较长的时间。

建立数据库组要收录树种及其序列信息,采样、制备和平台建设等工作量巨大;而木材国际贸易线路多产销链广,也增加了工作量,对人力、物力和时间均是挑战。

4) 需要根据木材DNA降解情况,选择适合的DNA提取方法。

提取新鲜植物DNA常用的方法有:十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)法;植物DNA提取试剂盒(DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen)和十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulphate, SDS)法等。

但由于木材DNA会发生降解,上述新鲜植物DNA提取方法并不能直接用于木材DNA提取,需要适当增加样品量和试剂量。

而且,对于DNA降解程度较严重的心材和储存时间较长的木材,在DNA提取缓冲液中,还需添加昂贵的试剂,如苯甲酰溴(N-phenacylthiazolium bromide, PTB)^[1],使成本大幅增加。因此,需要根据木材DNA的降解情况,选择适合的提取方法^[1,12]。

4 展望

中国科学院、中国林科院、南京林业大学和安徽农业大学等科研机构及高等院校,开展了利用DNA技术进行木材树种鉴别和产地跟踪的研究,并取得一定进展。目前多以单个样本为研究对象,尚不能说明种内的变异,鉴别结果有效性受限^[12]。

另外,目前的研究多注重属内树种间的鉴别,与其他科属树种的比较研究不多。建议在以下几方面加强木材DNA技术研究:

1) 加大资金投入。充足的资金是工作开展的重要保障,包括设备的购置、样品采集、运输,以及试剂的提取和人员的培训等,均需资金投入。

2) 加大研发力度,降低成本。木材DNA的提取仍然是技术瓶颈,需要尽快开发出经济而有效的DNA提取方法。降低鉴定成本,才能有助于DNA技术的推广应用。

3) 加强合作建立数据库。为了促进木材贸易全球化,必须建立完备的数据库,建立类似GenBank的全球化公共数据库,科研人员既可向库中添加数据,也可索取参考数据,实现信息资源共享并降低成本。

参考文献:

- [1] 张蓉,殷亚方,徐魁梧,等.基于DNA的木材树种识别研究进展及展望[J].南京林业大学学报(自然科学版),2014,38(1):151-156.
- [2] Kress WJ, Erickson DL, Swenson NG, et al. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot [J]. Public Library of Science ONE, 2010, 5(11): e15409.
- [3] Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, et al. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(44): 18621-18626.
- [4] Gonzalez MA, Baraloto C, Engel J, et al. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes [J]. Public Library of Science ONE, 2009, 4(11): e7483.
- [5] China Plant BOL Group, Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [6] 陈勇,李茗,宿海颖.木材追踪技术的新进展及其应用[J].世界林业研究,2011,24(5):36-39.
- [7] Tsumura Y, Kado T, Yoshida K. Molecular database for classifying Shorea species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products [J]. Journal of Plant Research, 2011, 124(1): 35-48.
- [8] 蒋敏杰,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):107-109.
- [9] Jiao L, Yin Y, Cheng Y, et al. DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis*: Comparison of data from heated or aged wood samples [J]. Holzforschung, 2014, 68(4): 487-494.
- [10] 周延清,杨清香,张改娜.生物遗传标记与应用[M].北京:化学工业出版社,2008:96-194.
- [11] Zhang R, Xu K, Ye K. Concentration and distribution of nuclei and plastids in xylem cells in *Cunninghamia lanceolata* and *Aquilaria sinensis* [J]. Bioresources, 2015, 10(1): 1304-1317.

(下转第50页)

表 6 5 种木材优化干燥基准下的干燥质量和干燥周期

Tab. 6 Drying quality and drying duration for lumber with an optimized drying schedule

树种编号	终含水率/%	分层含水率偏差/%	残余应力/%	弯曲/%				开裂		干燥周期/d
				顺弯	横弯	翘弯	扭曲	纵裂/%	内裂/条	
1	9.3	2.5	2.1	0.9	0.3	2.1	0.8	3.1	0	25
2	9.5	2.7	1.8	1.1	0.5	2.5	0.6	3.8	0	20
3	9.5	2.3	2.5	0.7	0.4	2.8	1.1	4.2	0	22
4	9.9	2.1	2.3	0.8	0.6	2.9	0.9	5.2	0	20
5	9.7	2.5	2.7	1.0	0.7	3.1	1.4	3.9	0	21
标准规定值 (二级)	8~12	3.5	≤3.5	2.0	1.0	4.0	2.0	6	不许有	

3 结论

1) 采用本试验确定的 5 种珍贵热带硬阔叶树材的优化干燥基准,干燥锯材的终含水率、分层含水率偏差、残余应力、弯曲和开裂等,均满足 GB/T 6491-2012 中干燥质量等级二级要求。

2) 按照优化基准进行干燥,5 种珍贵树种木材的干燥周期可缩短到 20~25 天,干燥效率明显提高,满足企业干燥生产的需要。

3) 建议 5 种珍贵树种木材干燥前期采取低温慢干的干燥基准,且均不宜在露天环境中进行大气干燥处理;实际生产中,还应根据干燥窑的具体条件以及锯材规格、初含水率等参数,适当调整干燥基准。

参考文献:

[1] 谢雪梅,刘波,孙华林,等.我国四种珍贵阔叶人工林木材的机械加工性能评价[J].木材工业,2014,28(5):36-40.

[2] 蔡家斌,潘彪,时兴洋.红木干燥的基本方法[J].林业科技开发,2000,14(1):56-57.

[3] 李大纲,李欣荣.非洲花梨木干燥工艺的研究[J].林产工业,2000,27(3):19-21.

[4] 黄塞北,高鑫,曹新民,等.四种热带硬阔叶材干燥特性研究//第十三届全国木材干燥学术研讨会论文集[C],2011.

[5] 董会军,刘迎丽.大红酸枝、缅甸花梨和亚花梨木材渗透性的研究//第十三届全国木材干燥学术研讨会论文集[C],2011.

[6] 王喜明.木材干燥学[M].北京:中国林业出版社,2007.

(责任编辑 张一萍)

(上接第 34 页)

[12] Marcel E, Henry B, Barbara G. Polymorphic microsatellites for forensic identification of agarwood (*Aquilaria crassna*) [J]. Forensic Science International, 2010, 197(1): 30-34.

[13] Ogden R, McGough HN, Cowan RS, et al. SNP-based method for the genetic identification of Ramin *Gonystylus* spp. timber and products: Applied research meeting CITES enforcement needs[J]. Endangered Species Research, 2009, 9(3): 255-261.

[14] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 5-21.

[15] 黄映苹. DNA 分子标记研究进展[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学、医学版), 2010, 21(2): 27-36.

[16] Celine Jolivet, Bernd Degen. Use of DNA finger prints to control the origin of sapeli timber (*Entandrophragma cylindricum*) at the forest concession level in Cameroon[J]. Forensic Science International: Genetics, 2012(6): 487-493.

[17] 陈洁,徐斌,刘小丽,等.中国木材合法性认定体系路径选择[J].世界林业研究,2014,27(5):61-66.

[18] 陈绍志,李剑泉,徐斌.中国应对木材非法采伐的政策与行动[J].国际木业,2013(9):1-3.

[19] 杨英军,耿森,李爱江.从落叶果树韧皮部提取 DNA[J].分子植物育种,2006(s2):142-146.

[20] 裴南才.利用 DNA 条形码技术识别植物物种[J].应用生态学报,2012,23(5):1240-1246.

[21] David M Spooner. DNA Barcoding will frequently fall in complicated groups: An example in wild potatoes [J]. American Journal of Botany, 2009, 96(6): 1177-1189.

(责任编辑 向琴)

