

## 分子生物学技术应用于木材识别的研究进展

伏建国<sup>1</sup>, 刘金良<sup>2</sup>, 杨晓军<sup>1</sup>, 安榆林<sup>1</sup>, 骆嘉言<sup>2</sup>

(1. 江苏出入境检验检疫局, 江苏 南京 210001; 2. 南京林业大学 木材工业学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 木材识别技术的进步对于木材科学的发展及保护森林资源意义重大。随着木材 DNA 提取方法的不断突破, 分子生物学技术开始应用于木材及木制品的材料种鉴定及来源地识别, 这对于阻止木材的非法砍伐及贸易具有重要意义。对近年来研究者在木材分子识别技术领域取得的进展进行了概述, 介绍了木材 DNA 提取常用的方法、存在的困难、改良的措施及不同提取方法获得的 DNA 质量; 在木材树种鉴定方面, 主要介绍了微卫星、单核苷酸多态性和 DNA 条形码技术的应用进展; 列举了分子生物学技术在木材来源地的鉴定中的成功案例; 最后, 分析了木材分子识别技术仍存在的问题, 并对其发展及应用前景进行了展望。参 43

**关键词:** 木材学; 识别; DNA 提取; 微卫星标记; 单核苷酸多态性; DNA 条形码; 综述

**中图分类号:** S781.1; Q341      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2013)03-0438-06

## A review of wood identification based on molecular biology technologies

FU Jianguo<sup>1</sup>, LIU Jinliang<sup>2</sup>, YANG Xiaojun<sup>1</sup>, AN Yulin<sup>1</sup>, LUO Jiayan<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Nanjing 210001, Jiangsu, China; 2. College of Wood Science and Technology, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** The prominence of wood for the human society and progress in its identification technologies have been of great importance in the development of wood science and forest resource protection. Along with continuous breakthroughs in wood DNA extraction methods, molecular biology technologies have been applied to wood and wood assortment identification. In this paper the progress of molecular technology for wood identification was reviewed. Methods used in wood DNA extraction along with questions and improvement measures were presented. Technologies used in wood identification, such as microsatellite, single nucleotide polymorphism, and DNA barcoding, were reviewed. Also, successful instances of molecular biology technologies utilized in wood resource identification were described. Finally, problems and prospects of molecular technologies for wood identification were analyzed. [Ch, 43 ref.]

**Key words:** wood science; identification; DNA recovery; simple sequence repeat; single nucleotide polymorphisms; DNA barcoding; review

木材是世界四大原材料(木材、钢铁、水泥、塑料)之一, 是人类赖以生存和发展的宝贵资源, 也是国民经济和社会发展中难以替代的战略性资源。20 世纪 90 年代以来, 随着世界木材消费量的快速增长, 木材资源的短缺和匮乏日益显现, 非法砍伐和贸易严重破坏了林木资源的可持续利用。为了保护森林资源, 很多国家出台了保护森林的法规和政策, 对木材的合法性提出了要求, 如美国的《雷斯法案》(2008 年修订案)要求, 所有输美的木制品都应提供木材供应的合法来源, 包括使用的植物种类的拉丁名、采伐的国家、数量、价值等。因此, 木材树种的鉴定及来源的识别对于保护森林资源, 促进木材及

收稿日期: 2012-04-23; 修回日期: 2012-06-05

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目(2008IK237)

作者简介: 伏建国, 农艺师, 博士研究生, 从事出入境植物检疫及物种资源查验工作。E-mail: fujg@jsci.gov.cn。通信作者: 安榆林, 研究员, 从事出入境植物检疫工作。E-mail: anyl@jsci.gov.cn

木制品贸易的健康发展等方面意义重大。传统的形态学方法只能鉴定木材的种类(通常鉴定不到种的水平),无法识别木材的来源。随着分子生物学技术的发展,分子标记及DNA条形码技术开始应用于木材树种的鉴定及来源识别<sup>[1]</sup>。为了让更多的人了解该项技术,方便木材科学研究者开展分子识别方面的研究工作,笔者对分子生物学技术在木材识别领域的发展及应用进行了归纳和总结,从木材DNA提取、木材树种分子鉴定及木材来源地的分子验证技术3个方面的研究进展进行概述。

## 1 木材DNA提取技术

### 1.1 木材DNA提取常用的方法

对于新鲜植物组织的DNA提取,已有成熟的方法,如很多商业试剂盒及十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法<sup>[2]</sup>都可以完成高质量DNA的提取,而木材DNA的提取方法目前仍处于试验和摸索阶段。自1998年De Filippis<sup>[3]</sup>利用改良的CTAB法成功提取刺槐*Robinia pseudoacacia*木材DNA以来,后继学者多采用改良的CTAB或商业试剂盒(多采用DNeasy Plant Mini Kit)先后从栎属*Quercus* spp.<sup>[4-5]</sup>,松属*Pinus* spp.<sup>[6]</sup>,棱柱木*Gonystylus bancanus*<sup>[7]</sup>,龙脑香科Dipterocarpaceae<sup>[8]</sup>等多种木材中提取出可满足聚合酶链式反应(PCR)扩增的DNA,这些改良措施主要有以下2个方面。

1.1.1 样品前处理 针对木材DNA容易污染、降解、含量低等难点,提取木材DNA时,多数学者都改良了相应的前处理措施。为了避免或减少外源DNA污染,木材DNA提取最好在洁净无菌的环境下操作,采取相应的表面消毒措施或去除表层木材样品<sup>[4,6]</sup>。为了减少提取过程中DNA进一步降解,木材样品在破碎过程中应避免温度太高,多在液氮冷冻下破碎。木材中DNA含量低,为了让有限的DNA充分释放,样品破碎尽量彻底,在DNA抽提液中水浴时间一般较长,很多研究采用65℃水浴过夜<sup>[7,9]</sup>。

1.1.2 加入去除PCR扩增抑制物质 木材DNA中很多抑制PCR扩增的物质难以去除,改良方法中多采用向提取液中加入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、蛋白酶K、巯基乙醇等物质去除木材DNA中抑制PCR扩增的物质。现有研究表明,加入PVP去除抑制物效果较为明显<sup>[6,9]</sup>。但对于PVP的用量,目前没有统一标准,没有学者对此进行专门的比较研究。除了PVP外,加入N-phenacylthiazolium bromide (PTB, C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>BrNOS)也被证实能够显著提高木材DNA提取质量。多聚嘧啶序列结合蛋白(PTB)常用于古木材DNA提取<sup>[10-11]</sup>,去除梅拉德反应物,有利于DNA的释放<sup>[12]</sup>。Asif等<sup>[7]</sup>利用CTAB和DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)试剂从干燥处理过的棱柱木中获得DNA产量和质量都很低,无法实现PCR扩增,加入PTB后,提取的DNA可以扩增出800 bp的叶绿体DNA片段。Tang等<sup>[13]</sup>也证实了PTB不仅提高了DNA获取量,同时明显提高了扩增成功率。利用PTB方法,砍伐4 a,自然干燥,经过处理的白橡木*Quercus fabri*,仍然能够扩增出1 000 bp的片段。

### 1.2 木材DNA提取取得的进展

2000年以前,由于木材识别主要是通过宏观特征及显微特征相结合的形态学鉴定方法,且多数人认为无法从木材中获得满足分子生物学鉴定所需的DNA,因此,关于木材DNA提取及分子鉴定领域的研究极少。随着De Filippis等<sup>[3]</sup>和Dumolin-Lapègue等<sup>[5]</sup>分别从新鲜和干燥的木材中提取出可用于普通PCR扩增的DNA后,关于木材DNA提取的文章及报道越来越多,木材DNA的提取取得了以下进展:①多个树种的木材DNA提取获得成功。由于不同种类木材的物理结构及所含的化学物质存在一定的差异,适合某一树种木材DNA提取方法也许并不适用于其他树种。据报道,目前已从壳斗科Fagaceae<sup>[4-5]</sup>,龙脑香科<sup>[8]</sup>,松科Pinaceae<sup>[6]</sup>,豆科Leguminosae<sup>[3]</sup>,瑞香科Thymelaeaceae<sup>[7]</sup>,杉科Taxodiaceae<sup>[13]</sup>,木犀科Oleaceae<sup>[13]</sup>等多个科的木材中提取出可用于PCR扩增的DNA,证明了木材DNA提取及分子鉴定的光明前景。②从处理过的木材中提取DNA获得成功。热处理、化学处理、紫外线照射等都会加速木材DNA降解<sup>[9]</sup>,相对于新鲜木材,从处理过的木材中提取DNA更加困难。目前,从处理后的木材中提取DNA获得了较大突破,Dumolin-Lapègue等先后从干燥处理过的木材中提取出可用于PCR扩增的DNA<sup>[4-5,8]</sup>;Deguilloux等<sup>[14]</sup>从经过高温和化学处理过的成品橡木桶中提取出DNA,能够满足橡木桶来源地的分子生物学识别;Reynolds等<sup>[6]</sup>从水浸处理后的木材中提取出DNA,并扩增出400 bp的叶绿体基因片段和600 bp的核糖体基因片段。③从古木中提取DNA获得成功。树木自砍伐后,木材DNA快速降解,因此,木材存储的时间越长,提取DNA的难度越大。但是,近年来的研究表明:从一些年代久远

的木材中仍然可以提取到 DNA。1999 年, Deguilloux 等<sup>[5]</sup>从 600 a 前的橡木中提取出 DNA, 并扩增出 290 bp 的叶绿体片段; 2006 年, Deguilloux 等<sup>[15]</sup>从公元 260 年前的橡木中提取出可用于遗传分析的 DNA; 2006 年, Liepelt 等<sup>[16]</sup>从 11 500 a 前的古木中提取出 DNA, 并通过叶绿体 *Trn* 区域的扩增将它鉴定到属的水平。

## 2 木材树种分子鉴定技术

传统的木材树种鉴定技术建立在木材解剖学基础上, 主要通过木材宏观及微观特征相结合的方法实现, 对鉴定者的鉴定知识和经验要求较高, 一般只能确定到属的水平, 很难鉴定到种的水平。随着分子生物学技术的发展, DNA 分子标记及 DNA 条形码等技术开始应用于木材树种的分子鉴定, 给木材鉴定技术带来了新突破。

### 2.1 利用微卫星标记鉴别木材树种

微卫星, 又称简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 最初是由 Tautz 等<sup>[17]</sup>在 1984 年发现, 1989 年 Litt 等<sup>[18]</sup>命名为微卫星 (microsatellite)。微卫星标记的原理是由几个核苷酸 (1~6 个) 为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列, 如  $(GA)_n$ ,  $(AC)_n$ ,  $(GAA)_n$  等, 在染色体上呈随机分布, 由于重复次数不同及重复程度的不完全而造成了每个基因座上等位基因的多态性。由于微卫星具有高度的多态性, 目前已被广泛应用于植物种质资源的鉴定, 同时也是木材树种鉴定的有效工具。Dumolin-Lapègue 等<sup>[5]</sup>利用叶绿体微卫星差异, 成功地把红橡木 *Quercus rubra* 和白橡木 2 个树种的木材区分开来。Rachmayanti 等<sup>[8]</sup>研究结果表明, 利用叶绿体 SSRs, 能够将龙脑香科的 5 个不同树种的木材区别开来。由于微卫星技术需要进行微卫星座位的筛选和特异引物的开发, 需要大量的前期研究工作, 目前在木材树种鉴定中应用的并不广泛。

### 2.2 利用单核苷酸多态性鉴别木材树种

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs), 主要是指在基因组水平上由于单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。1996 年, 由 Lander<sup>[19]</sup>首先正式提出使用 SNPs 为新一代分子标记, 随后在物种鉴定、物种起源与亲缘关系、遗传育种等领域得到了广泛的应用。1999 年, Germano 等<sup>[20]</sup>利用 SNPs 技术成功区分了在形态上难以区分的红云杉 *Picea rubens*, 黑云杉 *P. mariana* 和白云杉 *P. glauca* 等 3 个近缘种。Fladung 等<sup>[21]</sup>利用 SNPs 将杨属 *Populus* 不同种及其杂交种成功区分开来。随着木材 DNA 提取技术的日益成熟, SNPs 开始应用于木材树种的鉴定及来源地的验证。2008 年, Ogden 等<sup>[22]</sup>通过扩增 *matK*, *ropC1*, *ropB*, *accD* 和 *ndhJ* 等 5 个叶绿体基因片段, 发现棱柱木属 *Gonysylus* 多个 SNPs 位点, 其中 *matK* 含有的 SNPs 最多, 最后筛选出该属 7 个种共有的 1 个 SNP 位点设计探针和引物, 能够将该属的木材与其他属木材区分开来, 为防止该属木材被非法贸易提供了快捷准确的鉴定工具。

### 2.3 利用 DNA 条形码技术鉴别木材树种

DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 是利用一段或几段标准的、易扩增的、种间差异显著大于种内差异的 DNA 片段来鉴别物种的新技术, 该概念最早由加拿大学者 Hebert 提出<sup>[23]</sup>。由于 DNA 条形码技术具有操作简单、不受个体发育阶段和形态特征的限制、鉴定快速准确等诸多优点, 该技术目前已在动植物分类鉴定研究中得到较为广泛应用<sup>[24-28]</sup>。木材的形态学鉴定需要专业技术及丰富的经验, 一般人很难胜任, DNA 条形码技术给木材鉴定领域带来了光明的前景。Liepelt 等<sup>[16]</sup>利用该技术将 1 万年前的古木鉴定到属的水平, Asif 等<sup>[7]</sup>和 Tang 等<sup>[13]</sup>用该方法实现了对干燥或处理过的木材树种进行了初步鉴定。由于木材 DNA 质量不高, 很难扩增出长的片段, 因此选择合适的 DNA 条形码是鉴别木材树种的关键。在植物中, 叶绿体基因组具有进化快、单亲遗传、变异稳定等优势<sup>[29]</sup>, 植物 DNA 条形码筛选主要集中在叶绿体基因组中<sup>[24-27]</sup>。又由于木材中叶绿体拷贝数多, 获取目标 DNA 几率大, 是鉴定木材树种最佳选择。因此, 木材 DNA 提取方法的研究也通常采用能否扩增出叶绿体基因组中一些候选条形码片段作为检验 DNA 提取质量的标准<sup>[4-5,9,13]</sup>。

## 3 木材来源地的分子验证技术

非法砍伐是造成森林资源遭受破坏的主要原因之一<sup>[30]</sup>。为了保护森林资源, 阻止非法砍伐, 很多国

家要求出口商提供木材的合法来源。形态学方法只能鉴定木材的种类, 而无法识别木材的来源。由于树木是多年生植物, 基因漂移、杂交等多种因素致使种群间存在很高的遗传多样性<sup>[31]</sup>, 通过对不同群体遗传多样性的详细分析就可以验证某一木材是否来源于某一群体。因此, 分子遗传学可用于木材来源地的验证。

目前, 利用分子生物学技术验证木材来源地的研究很多, 但多数研究仍处于试验阶段<sup>[32-34]</sup>, 仅有少数的研究成果在实际鉴定中得到了应用。葡萄酒的品质与储存葡萄酒的橡木桶产地具有一定的关系, 橡木来源地的鉴定对葡萄酒的真伪和质量的鉴定具有实际意义。2004 年, Deguilloux 等<sup>[14]</sup>从法国 10 个不同的制桶企业抽取了 131 个橡木样品, 通过 DNA 提取及叶绿体 DNA 标记的扩增来检测不同样品的基因型, 从而确定其真实的来源地是否与制桶企业声称的来源地一致。研究结果发现, 绝大多数抽检橡木的来源地与企业声称的相一致, 但有一些声称来自法国的橡木被检测出来源于东欧, 一些号称来源于著名产区的橡木其实来自普通产区。木材来源地的鉴定对于保护娑罗属 *Shorea* 树种具有重要意义, 2006 年, Cao 等<sup>[35]</sup>年利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术发现了印度尼西亚境内不同种群的娑罗属树种 *Shorea leprosula* 存在明显的差异。由于 AFLP 对 DNA 质量的要求较高, 不适合用于木材的识别。2009 年, Nuroniah<sup>[36]</sup>将 AFLP 标记转换成序列特异性扩增区(sequence characterized amplified region, SCAR)标记, 建立了印尼波罗洲和苏门答腊 2 个地区 *Shorea leprosula* 的分子标记, 从而可以验证 *Shorea leprosula* 木材是来自波罗洲还是苏门答腊。

#### 4 问题与展望

高质量 DNA 的提取是木材分子识别的前提, 木材 DNA 的成功提取为分子生物学技术在木材识别中的应用奠定了坚实的基础, 10 余年的研究结果也表明了分子标记技术在木材识别领域应用的可行性及其光明前景, 但由于该领域的研究仍处于初期阶段, 还面临很多困难和挑战。木材 DNA 提取还存在以下几个方面的问题: ①提取方法仍在摸索阶段, 不同种类通常需要不同的处理, 没有统一规范的提取方法。②获得的 DNA 质量总体不高, DNA 降解问题难以解决, 通常只能扩增出短片段序列<sup>[4]</sup>。③DNA 中混杂的 PCR 扩增抑制物质难以去除, 对后续研究影响较大<sup>[37]</sup>。④一些年代久远、经过加工处理或保存不当的木材中无法提取出可用于分子研究的 DNA。在木材分子鉴定方面, 也同样存在很多需要解决的问题: ①缺乏大量的分子遗传学研究基础。用于鉴别木材的分子标记需要前期通过对大量样品的遗传差异研究来获得, Deguilloux 等<sup>[14]</sup>橡木桶来源地的鉴定是建立在 Petit 等<sup>[38]</sup>和 Deguilloux 等<sup>[39]</sup>对欧洲 2 600 个欧洲橡树种群叶绿体 DNA 研究基础上的, 这项工作不仅花费较高, 且费时费力。②目前的研究仅仅解决了少数几个种的材种鉴定, 或者是有限范围内的来源地验证, 更多种类及更大范围内的木材识别验证还需更深入地研究, 需要积累大量树种的 DNA 信息。③很多的遗传标记是在植物叶片提取的高质量 DNA 基础上筛选出来的, 在木材 DNA 中并不适用, 通常需要针对木材 DNA 的特点开发和筛选合适的分子标记。虽然木材分子识别还有很多困难需要克服, 但鉴于木材对于人类的重要性及保护森林资源的迫切性, 该技术具有很高的应用价值及市场前景, 越来越多的机构及学者投入了这一领域的研究工作<sup>[1,32-34,40-41]</sup>。随着植物 DNA 条形码技术的发展<sup>[42]</sup>及高通量测序技术的不断突破<sup>[43]</sup>, 以上困难和问题将会逐步得到解决, 木材分子识别将会成为一种成熟的常规技术而被广泛应用。

#### 参考文献:

- [1] FINKELDEY R, LEINEMANN L, GAILING O. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **85**: 1251 – 1258.
- [2] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, **19**: 11 – 15.
- [3] 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.
- [4] DEGUILLOUX M F, PEMONGE M H, PETIT R J. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA [J]. *Proc Biol Sci*, 2002, **269**: 1039 – 1046.

- [5] DUMOLIN-LAPEGUE S, PEMONGE M H, GIELLY L, *et al.* Amplification of oak DNA from ancient and modern wood[J]. *Mol Ecol*, 1999, **8**: 2137 – 2140.
- [6] REYNOLDS M M, WILLIAMS C G. Extracting DNA from submerged pine wood[J]. *Genome*, 2004, **47**: 994 – 997.
- [7] 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 Mol Biol Report*, 2005, **23**: 185 – 192.
- [8] RACHMAYANTI Y, LEINEMANN L, GAILING O, *et al.* Extraction, amplification and characterization of wood DNA from Dipterocarpaceae [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2006, **24**: 45 – 55.
- [9] RACHMAYNYI Y, LEINEMANN L, GAILING O. DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success [J]. *For Sci Int: Genetics*, 2009, **3**: 185 – 192.
- [10] GUGERLI F, PARDDUCCI L, PETIT R J. Ancient plant DNA: review and prospects [J]. *New Phytologist*, 2005, **166**: 409 – 418.
- [11] KEMP L M, KELMAN Z. The use of ancient DNA in paleontological studies [J]. *J Vert Paleontol*, 1999, **19**: 8 – 20.
- [12] KEMP B M, MONROE C, SMITH D G. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts [J]. *J Archaeol Sci*, 2006, **33**: 1680 – 1689.
- [13] TANG X, ZHAO G, PING L. Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA[J]. *Plant Mol Biol*, 2011, **77** (6): 609–617.
- [14] DEGYILLOUX M F, PEMONGE M H, PETIT R J. DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry [J]. *Ann For Sci*, 2004, **61**: 97 – 104.
- [15] DEGUILLLOUX M F, BERTEL L, CELANT A, *et al.* Genetic analysis of archaeological wood remains: first results and prospects [J]. *J Archaeol Sci*, 2006, **33**: 1216 – 1227.
- [16] LIEPELT S, SPERISEN C, DEGUILLLOUX M F, *et al.* Authenticated DNA from ancient wood remains[J]. *Ann Bot*, 2006, **98**: 1107 – 1111.
- [17] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, **12**: 4127 – 4138.
- [18] LITT M, LUTY J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene [J]. *Am J Human Genet*, 1989, **44**: 397 – 401.
- [19] LANDER E S. The new genomics: global views of biology [J]. *Science*, 1996, **274**: 536 – 539.
- [20] GERMANO J, KLEIN A S. Species-specific nuclear and chloroplast single nucleotide polymorphisms to distinguish *Picea glauca*, *P. mariana* and *P. rubens* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **29**: 109 – 111.
- [21] FLADUNG M, BUSCHBOM J. Identification of single nucleotides polymorphisms in different *Populus* species [J]. *Trees*, 2009, **23**: 1199 – 1212.
- [22] OGDEN R, MCGOUGH H N, COWAN R S, *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 Res*, 2008, **9**: 255 – 261.
- [23] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Royal Soc London Ser B: Biol Sci*. 2003, **270**: 313 – 321.
- [24] KRESS W J, WURDACK K J, ZIMMER E A, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 8369 – 8374.
- [25] NEWMASER S G, FAZEKAS A J, RAGUPATHY S. DNA barcoding in the land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach [J]. *Can J Bot*, 2006, **84**: 335 – 341.
- [26] CHASE M W, COWAN R S, HOLLINGSWORTH P M, *et al.* A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. *Taxon*, 2007, **56**: 295 – 299.
- [27] HOLLINGSWORTH P M, FORREST L L, SPOUGE J L, *et al.* A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**: 12794 – 12797.
- [28] CHEN S L, YAO H, HAN J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, **5**(1): 8613.
- [29] SCHAAL B A, HAYWORTH D A, OLSEN K M, *et al.* Phylogenetic studies in plants: problems and prospects [J]. *Mol Ecol*, 1998, **7**: 465 – 474.

- [30] BRACK D. Illegal logging and the illegal trade in forest and timber products[J]. *Int For Rev*, 2003, **5**: 195 – 198.
- [31] AUSTERLITZ F, MARIETTE S, MACHON N, *et al.* Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species[J]. *Genetics*, 2000, **154**: 1309 – 1321.
- [32] WONG K N, TAN W L, CHEW F T. Identification and characterization of microsatellite loci in *Intsia palembanica* (Leguminosae), a valuable tropical timber species[J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, **9**: 360 – 364.
- [33] LOWE A J, CROSS H B. The application of DNA methods to timber tracking and origin verification [J]. *IAWA J*, 2011, **32**(2):251 – 262.
- [34] 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.
- [35] CAO C P, FINKELDEY R, SIREGAR I, *et al.* Genetic diversity within and among populations of *Shorea leprosula* Miq. and *S. parvifolia* Dyer (Dipterocarpaceae) in Indonesia detected by AFLPs[J]. *Tree Genet Genomes*, 2006, **2**: 225 – 239.
- [36] NURONIAH H S. *Diagnostic Markers for the Identification of the Tree Species Shorea leprosula and S. parvifolia Dyer and the Geographic Origin of S. leprosula*[D]. Göttingen: Göttingen University. Optimus, 2009.
- [37] LEE A B, COOPER T A. Improved direct PCR screen for bacterial colonies-wooden toothpicks inhibit PCR amplification [J]. *Biotechniques*, 1995, **18**: 225 – 226.
- [38] PETIT R J, CSAIKL U M, BORDACS S, *et al.* Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and pattern of diversity based on data from over 2600 populations [J]. *For Ecol Manage*, 2002, **156**: 5 – 26.
- [39] DEGUILLLOUX M F, PEMONGE M H, BERTEL L, *et al.* Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools [J]. *Mol Ecol*, 2003, **12**: 1629 – 1636.
- [40] 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, doi 10.1007/s00226-011-0447-6.
- [41] 焦立超, 殷亚方, 孙清鹏, 等. 基于 DNA 的木材识别新技术发展与应用[J]. 木材工业, 2012, **26**(1): 27 – 30.  
JIAO Lichao, YIN Yafang, SUN Qingpeng, *et al.* Wood identification based on deoxyribonucleic acid methods [J]. *China Wood Ind*, 2012, **26** (1):27 – 30.
- [42] CJASE M W, FAY M F. Ecology: barcoding of plants and fungi [J]. *Science*, 2009, **325**: 682 – 683.
- [43] EIDJ, FEHRA, GRAY J, *et al.* Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules [J]. *Science*, 2009, **323**: 133 – 138.