

E-2 熱帯林生態系における野生生物種の多様性に関する研究

(4) 熱帯林構成樹種の系統進化学的研究

研究代表者 森林総合研究所生物機能開発部 津村義彦
森林総合研究所

生物機能開発部 遺伝分析研究室 津村義彦・吉村研介
集団遺伝研究室 吉丸博志・河原孝行

平成5-7年度合計予算額 22,432千円
(平成7年度予算額 6,535千円)

〔要旨〕フタバガキ科植物の系統関係を調査するために葉緑体DNA上にコードされている11の遺伝子についてPCR増幅を行い、各遺伝子10種類以上の制限酵素を用いてRFLP分析を行った。染色体数 $n=11$ 、 $n=7$ の2つのグループが明確に区別された。また近隣接合法（NJ法）を用いた系統樹は、基本的には最節約法の系統樹と同じ結果が得られた。これらの結果は*Neobalanocarpus*属が*Hopea*属のに含まれる以外はAshton及びSymintonの分類とよく一致した。*Neobalanocarpus heimii*の交配様式を明らかにする目的でアイソザイム分析およびRAPD分析を行った。その結果*Neobalanocarpus heimii*は1.065 (SD;.212)という極めて高い他殖率を示した。RAPDの結果もアイソザイムの結果をほぼ支持するものであった。ミトコンドリアDNAについては*coxI*で種間・種内ともに変異が検出された。2つの組み合わせで全個体の調査を行った。その結果5種が3つのパターンを持つものに分けることができた。RAPD分析では5種7集団を調査した結果、種内および種間の塩基置換率を求めた。*Hopea*属の塩基置換率を*Shorea*属と比較すると種内の塩基置換率は小さく、種間は大きい値を示した。

〔キーワード〕フタバガキ科、分子系統、葉緑体DNA、遺伝的分化、RAPD

1. 序

熱帯林は種多様性及び遺伝的多様性に富み、遺伝子資源の宝庫と言われている。しかし、近年これらの地域で起こっている急速な破壊は、種多様性の減少にとどまらず、種が長い（進化的）時間をかけて蓄積してきた遺伝的多様性の消失も引き起こしているものと考えられる。そこで遺伝子資源の宝庫とされる熱帯林を今後、遺伝子供給源として保全するためには、そこで将来にわたり進化が起こる可能性を備えた形で保全計画を立てる必要がある。しかし、これま

で熱帯林を遺伝的側面から研究した例はほとんどなく、熱帯林樹種間の系統分化等の関係も全く明らかにされていない。

2. 研究目的

本研究では、新たに遺伝子マーカー（アイソザイム遺伝子、葉緑体 DNA の RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)分析及び RAPD 分析(Random Amplified Polymorphic DNA)等)を用いて熱帯林の中でも特に重要なフタバガキ科樹木を遺伝子レベルで解明することによって、熱帯林を構成している種（フタバガキ科植物）がどの程度の遺伝的多様性を保有しているか、またどのような遺伝的な構造を呈しているかを明らかにすると共に、これらの種の系統関係及び進化的関係を明らかにする。

3. 研究方法

(1) フタバガキ科植物の分子系統

マレーシア森林研究所内フタバガキ科樹木園にてフタバガキ科樹木 10 属 30 種から葉組織を採取した。これら葉組織から改変 CTAB 法にて全 DNA を抽出した。約 5 g の葉組織を液体窒素で凍結した後、ミルサー（イワタニ株）を用いて細かなパウダー状になるまで粉碎した。これに 20ml の 2 × CTAB 緩衝液 (2% CTAB, 1.4M NaCl, 0.2% β -mercaptoethanol, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH8.0, 1% PVP-40) を加えホモジェナイズした。その溶液を 60°C で 30 分間インキュベートした。同量のクロロホルム溶液 (クロロフォルム: イソアミルアルコール= 24 : 1) を加え、15 分間ゆっくり攪拌した。その溶液を 4500 rpm で 15 分間、遠心分離し、水溶液層を新しいチューブに移した。3 分の 2 の容量のイソプロピルアルコールを加え、DNA を沈殿させた。その DNA を RNase 処理し、その後、TE 飽和フェノールで数回抽出を行った。

対象とした遺伝子は葉緑体 DNA 上にコードされている遺伝子で 25 種について、それらを PCR 増幅するためのプライマーのデザインを行った。またこれらの遺伝子のうち 11 種の遺伝子 (*rbcL*, *rpoB*, *petB*, *psbA*, *psbD*, *atpH*, 16S, *rpoC*, *psaA*, *petA*, *trnK*) について PCR 増幅が可能で RFLP 解析に適したものであった (Table 1)。PCR の条件は 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.01% gelatin, 9.1mM dNTP, 100 pmol プライマー, 0.2 μ g DNA, 2.5u Taq ポリメラーゼの反応液で 94°C 5 分後、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分で 35 サイクル行い、最後に 72°C 5 分反応させた。電気泳動で PCR 産物を確認後、エタノール沈澱法にて PCR 産物を精製後 *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *MspI*,

*Pst*I, *Rsa*I, *Sau*3A1, *Sty*I, *Taq*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Bsm*I, *Dra*I, *Eco*RI, *Nru*I, *Xba*I, *Xho*I, *Hap*II, *Cfr*13I, *Eco*T22I, *Apa*I, *Dpn*I, *Mbo*I, *Sca*I, *Alu*I, *Hha*I, *Mae*I, *Sac*I の制限酵素を用いて RFLP 解析を行った。RFLP 解析は制限酵素消化後 2%アガロースゲルで電気泳動を行い塩基置換のデータを収集した。また得られたデータはそれぞれの DNA フラグメントサイズを DNASIS を用いて推定し、種間のフラグメントの比較を行った。また DNA フラグメントの有無を 1、0 データに変換した。これらのデータをもとに Wagner Parsimony 法及び近隣接合法 (NJ 法) にて系統樹の作成を行った。また Bootstrap 解析も併せて行った。

(2) *Neobalanocarpus heimii* の交配様式

また交配様式の解明のために、Pasoh 試験地内の *Neobalanocarpus heimii* の 5 母樹を選出した。これらの 5 母樹の周囲約 100m には同種の交配可能な母樹はなく、孤立木であるものを選んだ。これら 4 母樹及び周囲の実生合計 79 個体から小枝及び葉組織の採取を行った (Table 3)。これらの葉組織から改良 CTAB 法により全 DNA を抽出した。抽出した個体別 DNA に関して RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) 解析を行った。RAPD の条件は以下のようにした。10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100, 0.01 % gelatin, 9.1 mM dNTP, 100 pmol プライマー, 50 ng of 鋳型 DNA, 0.5 units of Taq ポリメラーゼ。PCR 増幅は 94°C、5 min. の後、94°C を 45 秒、55°C を 30 秒、72°C を 2 分を 35 サイクル行い、最後に 72°C を 5 分を行った。RAPD 終了後、2%のアガロースゲルにて 50 V、1 時間の電気泳動を行い、DNA フラグメントの観察を行った。また小枝の内樹皮を用いてエステラーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコムターゼ、シキミ酸脱水素酵素等のアイソザイム分析を行った。アイソザイム分析は Wickneswari (1992) の方法にしたがってデンブengel による電気泳動法で行った。アイソザイムパターンは遺伝子型に置き換え、Ritland and Jain (1981) のモデルを用いて交配様式の推定を行った。この際、単一遺伝子座法および多遺伝子座法の両方の推定を試みた。

(3) *Hopea* 属の遺伝的多様性

フタバガキ科でどの様な種分化が進行しているかを調査するため、*Hopea* 属の 7 種について集団レベルでのサンプルの採取を行った (Table 5、6)。葉緑体 DNA の分子系統樹のデータから *Hopea* 属は *Shorea* 属とともに種分化の最も活発な属であるため、フタバガキ科の種分化のメカニズムを遺伝的に明らかにするために *Hopea* 属を選んだ。本研究ではミトコンドリア DNA の変異と RAPD の多型性調査を行った。ミトコンドリア DNA の調査では *cox*I, *cox*III の遺伝子をプローブとしサザンハイブリダイゼーションを行い種内および種間の遺伝的多型の検出

を行った。材料としてTable 8のものを用いた。プローブDNAは(0.1-0.2 μ g) は非RI方法のジゴキシゲニンでラベルする方法を用いた(Boehringer Mannheim Co. Ltd.)。DNAを転写したナイロンメンブレンは18時間、42°Cでハイブリダイザーションを行った。用いたハイブリ緩衝液は50% (w/v) formamide, 5 \times SSC, 0.5% (w/v) dry skim milk, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine sodium salt, 0.02% (w/v) SDS, 50mg/ml salmon sperm DNAであった。サザンハイブリダイザーション後、メンブレンは2 \times SSC, 0.1% SDS で15分間、室温で2度洗った。その後、0.1 \times SSC, 0.1% SDS洗淨緩衝液で68°C、15分の条件で2度の洗いをを行った。その後のケミルミネッセンス検出はプロトコルにしたがって行った(Boehringer Mannheim Co. Ltd.)。

RAPD分析では16種の10merのランダムプライマー (Operon Co.Ltd.) を用いてPCR 反応を行った(Table 7)。材料はTable 9のものを用いた。RAPDの条件は以下のようにした。10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.01% gelatin, 9.1 mM dNTP, 100 pmol プライマー, 50 ng of 鋳型 DNA, 0.5 units of Taq ポリメラーゼ。PCR増幅は94°C、5 min.の後、94°Cを45秒、55°Cを30秒、72°Cを2分を35サイクル行い、最後に72°Cを5分を行った。RAPD終了後、2%のアガロースゲルにて50V、1時間の電気泳動を行い、DNAフラグメントの観察を行った。得られたDNAフラグメントを1、0データに変換し、種内・種間の塩基置換率の推定を行った (Clark and Lanigan 1994)。

4. 結果及び考察

(1) フタバガキ科植物の分子系統

葉緑体DNA上にコードされている11の遺伝子についてPCR増幅を行い、各遺伝子10種類以上の制限酵素を用いてRFLP分析を行った(Fig. 1)。この手法は増幅した遺伝子の分子量が分かっているため、種間で制限酵素サイトが異なる場合、容易にそれらの検出ができる。しかしながら2%のアガロースゲルにて電気泳動を行っているため100bp以下の低分子のDNAフラグメントは識別が難しくなることがある。最終的には10属30種間で141の塩基置換が検出された。またこれら11の遺伝子について種間での塩基置換の程度を調べた。基本的には増幅したフラグメントサイズが大きいものほど検出される塩基置換は多いものであった。しかし16S, *atpH*, *atpH*, *psbA*, *psbD*はフラグメントのサイズに比べ検出される塩基置換数は少ないものであった。これらのデータから塩基置換率の推定を行った (Table 2)。属間の塩基置換を調べるため、属内の平均値を求めた。また系統樹を作成する際、祖先的な形質を持つと言われている*Upuna*属をoutgroupに指定した。最節約法を用いた系統関係はFig. 2の様になり、*Shorea*属及び*Hopea*属は明確な区別はつかなかった。しかし他の8属については属間の

関係が明確となった。また染色体数 $n = 11$ 、 $n = 7$ のグループが明確に区別された。例えば *Shorea* 属、*Hopea* 属、*Neobalanocarpus* 属、*Dryobalanops* 属は $n = 7$ のグループであり、Fig. 2 の上部にあたり、系統的には新しいグループであることが明らかになった。また *Upuna* 属を含む祖先的なグループは $n = 11$ であった。また近隣接合法 (NJ 法) を用いた系統樹は Fig. 3 の様になり、基本的には最節約法の系統樹と同じ結果が得られた。これらの結果は *Neobalanocarpus* 属が *Hopea* 属のに含まれる以外は Ashton 及び Syminton の分類と非常によく一致した。

(2) *Neobalanocarpus heimii* の交配様式

フタバガキ科の交配様式を明らかにする目的で各々の属等を代表する種について調査を試みる。今回 *Neobalanocarpus heimii* について調査した。これらの母樹及び母樹の周囲の実生群を調査対象とした。これらすべての個体から全 DNA の抽出を行った。*Neobalanocarpus heimii* の分析に使用可能なプライマーのスクリーニングを行うため Operon 社製のプライマーキットの OPU, OPT 合計 40 種のプライマーでの増幅を調査した。そのうち本研究に使用可能な 10 種のプライマーが確認された。これらを用い、採取した 4 母樹及びそれらの実生の DNA をサンプルとし RAPD 分析を行った。これらの DNA フラグメントパターンから DNA フラグメントのあるものを 1、ないものを 0 とスコアし、各母樹及び実生の DNA パターンを読みとった。これらのデータから推測される *Neobalanocarpus heimii* の交配様式は自殖の割合がきわめて低いものであると考えられる。その結果、親個体が持っていないフラグメントが多数見られた。これらのデータの解析についてはまだ確定した方法がないため現在解析方法及び理論の構築を行っている。少なくとも以上のデータからいえることは複数の花粉親が関与していることは間違いなく、高い他殖率をしていると推定される。

また理論の確立しているアイソザイム分析も併せて行った。アイソザイム分析は 5 遺伝子座 (*Est-1*, *Gpi-2*, *Pgm-2*, *Shd-1*, *Ugp-1*) の分析を行った。それぞれの遺伝子座で 2 ~ 3 個の対立遺伝子が見られた。これらの個体別の遺伝子型データを Ritland and Jain の他殖率推定の多遺伝子座推定法 (Mutilocus) 及び単一遺伝子座推定法 (Singlelocus) を用いて解析を行った。その結果 *Neobalanocarpus heimii* は 1.065 (SD;.212) という極めて高い他殖率を示した (Table 4)。RAPD 法はほとんどが優性遺伝型の遺伝をするため、ヘテロ接合型が優性のホモ接合型と区別できないので外交配率を算出する上で不利になる。しかしながら、RAPD 法はプライマーを増やせばいくらかでも遺伝子座を増やす事が可能である。そのため RAPD 法でヘテロ接合型の検出が可能になれば、より正確な交配様式の解

明ができるようになることが期待される。

本研究は実際に各母樹から種子を集めるのではなく、周囲の実生群をその母樹由来とみなして解析したため多少の contamination があることが予想されたが、データから 1～2 割程度の contamination が存在した。この場合の contamination とは他の母樹由来の実生が認められたということである。これは DNA フラグメントパターンからその母樹由来とは考えられないものが見られたためである。またこの事実は、この種の種子を運ぶ小動物が存在する、または風による飛散距離が非常に遠距離に及ぶことを示唆している。

(3) *Hopea* 属の遺伝的多様性

ミトコンドリア DNA については 15 種類の制限酵素を用いてスクリーニングを行ったが、*coxIII* では種間では変異が見られたが、種内では変異は検出されなかった。*coxI* では種間・種内ともに変異が検出された (Fig. 4)。制限酵素 *PstI* と *HindIII* において *H.dyeri* で種内変異が検出されたためこれら 2 つの組み合わせで全個体の調査を行った。その結果 5 種が 3 つのパターンを持つものに分けることができた (Fig. 5)。一般的に植物のミトコンドリアゲノムは構造変異を起こしやすく、また母性遺伝することが知られているため集団間分化を調べるためのよい指標となると言われている。本調査で種内変異が検出された *coxI-PstI* と *coxI-HindIII* の 2 つの組み合わせでは *H.dyeri* 以外の樹種では種内変異が検出されなかったため集団間分化を詳細に調べることができなかった。しかし、検出された 3 つの変異で種間の関係がより明確になった。

RAPD 分析では 5 種 7 集団を調査した結果、16 種のプライマーで合計 161 本の DNA のフラグメントが検出された (Fig. 6)。それぞれのプライマーでの RAPD のバンドは 1 から 12 本検出され、平均では 5.56 であった。合計では 14 種類のプライマーで 169 本のバンドが検出された。これらのデータから塩基置換率を推定した。平均塩基置換率種内では *H.dyeri* で 0.0108 ± 0.0014 、*H.ferruginea* で 0.0152 ± 0.0029 、*H.glaucescens* で 0.0083 ± 0.0018 、*H.myrtifolia* で 0.0080 ± 0.0013 、*H.pierrei* で 0.01115 ± 0.0034 であった (Table 8)。これは *Shorea* で推定されたものに比べ小さい値を示した (Harada et al. 1994)。また種間の平均塩基置換率は *Shorea* と比較すると幾分大きな値を示した (Table 9)。*Hopea* 属の塩基置換率を *Shorea* 属と比較すると種内の塩基置換率は小さく、種間は大きい値を示した。このことは、*Hopea* 属が *Shorea* 属よりも集団の有効な大きさが幾分小さいのかまたは 1 世代の時間が多少小さいことなどが考えられる。

5. まとめ

フタバガキ科植物の系統関係を調査するために葉緑体 DNA 上にコードされている 11 の遺伝子について PCR 増幅を行い、各遺伝子 10 種類以上の制限酵素を

用いて RFLP 分析を行った。最節約法を用いた系統関係では属間の関係を明確にした。しかし、*Shorea* 属及び *Hopea* 属は明確な区別はつかなかった。また染色体数 $n=11$ 、 $n=7$ のグループが明確に区別された。例えば *Shorea* 属、*Hopea* 属、*Neobalanocarpus* 属、*Dryobalanops* 属は $n=7$ のグループであり、Fig. 3 の上部にあたり、系統的には新しいグループであることが明らかになった。また *Upuna* 属を含む祖先的なグループは $n=11$ であった。また近隣接合法 (NJ 法) を用いた系統樹は、基本的には最節約法の系統樹と同じ結果が得られた。これらの結果は *Neobalanocarpus* 属が *Hopea* 属のに含まれる以外は Ashton 及び Syminton の分類と非常によく一致した。本研究では属間の系統関係はある程度明らかになったため、今後は属内の近縁な種間の調査を行う必要がある。

Neobalanocarpus heimii の交配様式を明らかにする目的でアイソザイム分析および RAPD 分析を行った。アイソザイム分析は 5 遺伝子座 (*Est-1*, *Gpi-2*, *Pgm-2*, *Shd-1*, *Ugp-1*) の分析を行った。これらの個体別の遺伝子型データを Ritland and Jain の他殖率推定の多遺伝子座推定法 (Mutilocus) 及び単一遺伝子座推定法 (Singlelocus) を用いて解析を行った。その結果 *Neobalanocarpus heimii* は 1.065 (SD; .212) という極めて高い他殖率を示した。RAPD の結果もアイソザイムの結果をほぼ支持するものであった。しかし、RAPD 法はほとんどが優性遺伝型の遺伝をするため、ヘテロ接合型が優性のホモ接合型と区別できないので外交配率を算出する上で不利になる。しかしながら、RAPD 法はプライマーを増やせばいくらかでも遺伝子座を増やす事が可能である。そのため RAPD 法でヘテロ接合型の検出が可能になれば、より正確な交配様式の解明ができるようになることが期待される。また可能であれば結実の年になるべく多くの個体から直接種子を採取し交配様式を解明していく必要があると思われる。

ミトコンドリア DNA については *coxI* で種間・種内ともに変異が検出された。制限酵素 *PstI* と *HindIII* において *H. dyeri* で種内変異が検出されたためこれら 2 つの組み合わせで全個体の調査を行った。その結果 5 種が 3 つのパターンを持つものに分けることができた。

RAPD 分析では 5 種 7 集団を調査した結果、16 種のプライマーで合計 161 本の DNA のフラグメントが検出された。種内および種間の塩基置換率を求めた。これらと同様の研究は *Shorea* 属で報告されている。*Hopea* 属の塩基置換率を *Shorea* 属と比較すると種内の塩基置換率は小さく、種間は大きい値を示した。このことは、*Hopea* 属が *Shorea* 属よりも集団の有効な大きさが幾分小さいのかまたは 1 世代の時間が多少小さいことなどが考えられる。

多様性の研究には由来の明確な遺伝マーカーを開発する必要がある。また研究の目的によっても多型の程度の異なるマーカーを開発すればより詳細な成果

が得られると考える。

6. 本研究により得られた成果

フタバガキ科植物の系統関係を葉緑体 DNA の遺伝子の PCR-RFLP 解析により明らかにした。これらの結果は *Neobalanocarpus* 属が *Hopea* 属のに含まれる以外は Ashton 及び Symington の分類とよく一致した。

Neobalanocarpus heimii の交配様式をアイソザイム分析および RAPD 分析を用いて調査した。その結果 *Neobalanocarpus heimii* は 1.065 (SD;.212) という極めて高い他殖率を示した。RAPD の結果もアイソザイムの結果をほぼ支持するものであった。

Hopea 属の遺伝的多様性をミトコンドリア DNA および RAPD 分析で調査した。5 種 7 集団を調査した結果、種内および種間の塩基置換率を求めた。*Hopea* 属の塩基置換率を *Shorea* 属と比較すると種内の塩基置換率は小さく、種間は大い値を示した。

7. 参考文献

- Ashton, P.S. 1982. Dipterocarpaceae. Flora Malesiana. Series I - Spermatophyta. Flowering Plants Vol. 9, part 2. pp.552.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Harada, K., A. Kinoshita, N.A.A. Shukor, H. Tachida and T. Yamazaki 1994 Genetic variation estimated in three *Shorea* species by the RAPD analysis. *Jpn.J.Genet.* 69:713-718.
- Ritland, K. and Jain, S.K. 1981 A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47:35-52
- Swofford, D.L. 1990. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, Version 3.0q. Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey.
- Sugiura, M., Shinozaki, K. Zaita, N., Kusuda, M., and Kumano, M. 1986. Clone bank of tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: Mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Sci.* 44:211-216.
- Symington, C.F. 1943 Forester's manual of dipterocarps. Malayan Forest Records No.16. 244pp, Penerbit Universiti Malaya, Kuala Lumpur
- Tsumura, Y., T. Kawahara, Wickneswari, R. and K. Yoshimura (1996) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes. *Theoretical and Applied Genetics* (In press)
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990.

DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

国際共同研究等の状況

カウンターパート：マレーシア森林研究所 Wickneswari Ratnam

8. 研究発表

津村義彦・Wickneswari R. フタバガキ科植物の系統分類の再考 日本林学会講演要旨 平成4年4月

津村義彦・Wickneswari R. フタバガキ科植物の分子系統分類 日本熱帯生態学会講演要旨 平成4年6月

Tsumura, Y., R. Wickneswari, T. Kawahara and K. Yoshimura Phylogeny of Dipterocarpaceae using RFLP of chloroplast DNA. XV International Botanical Congress p.242 Yokohama, Japan, 1993

Tsumura, Y., T.Kawahara, H.Yoshimaru, Wickneswari R. and N. Muhammad Intraspecific variations of several species in Hopea (Dipterocarpaceae) using molecular markers. Research Report of FRIM/NIES/UPM Joint Research Projects for 1994

Tsumura, Y., T.Kawahara, H.Yoshimaru, Wickneswari R Molecular phylogenetic relationship of Dipterocarpaceae. Research Report of FRIM/NIES/UPM Joint Research Projects for 1993

Tsumura, Y., T. Kawahara, Wickneswari, R. and K. Yoshimura (1996)
Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes. Theoretical and Applied Genetics (In press).

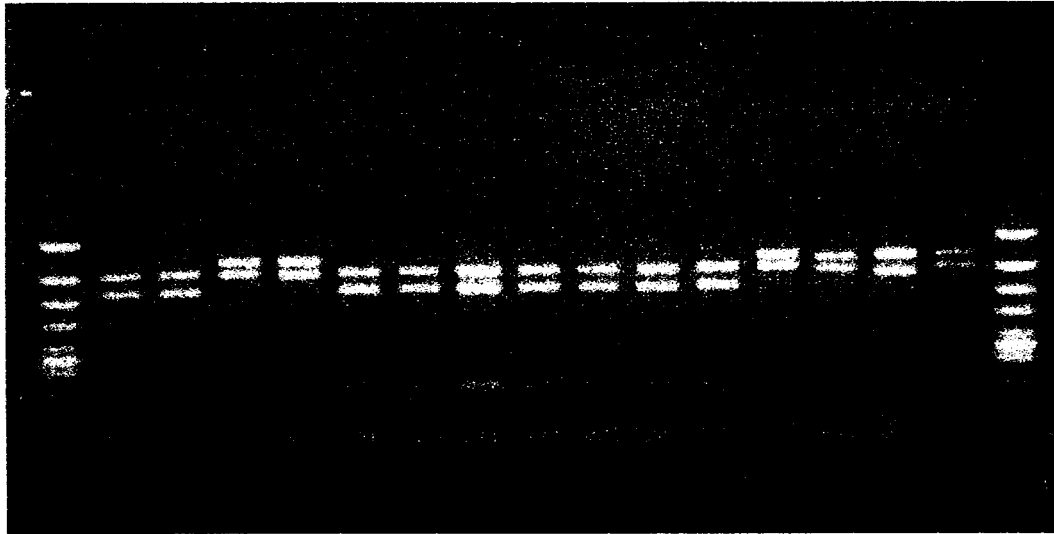


Fig. 1 PCR-RFLP pattern of *petB* digested by *HaeIII*.

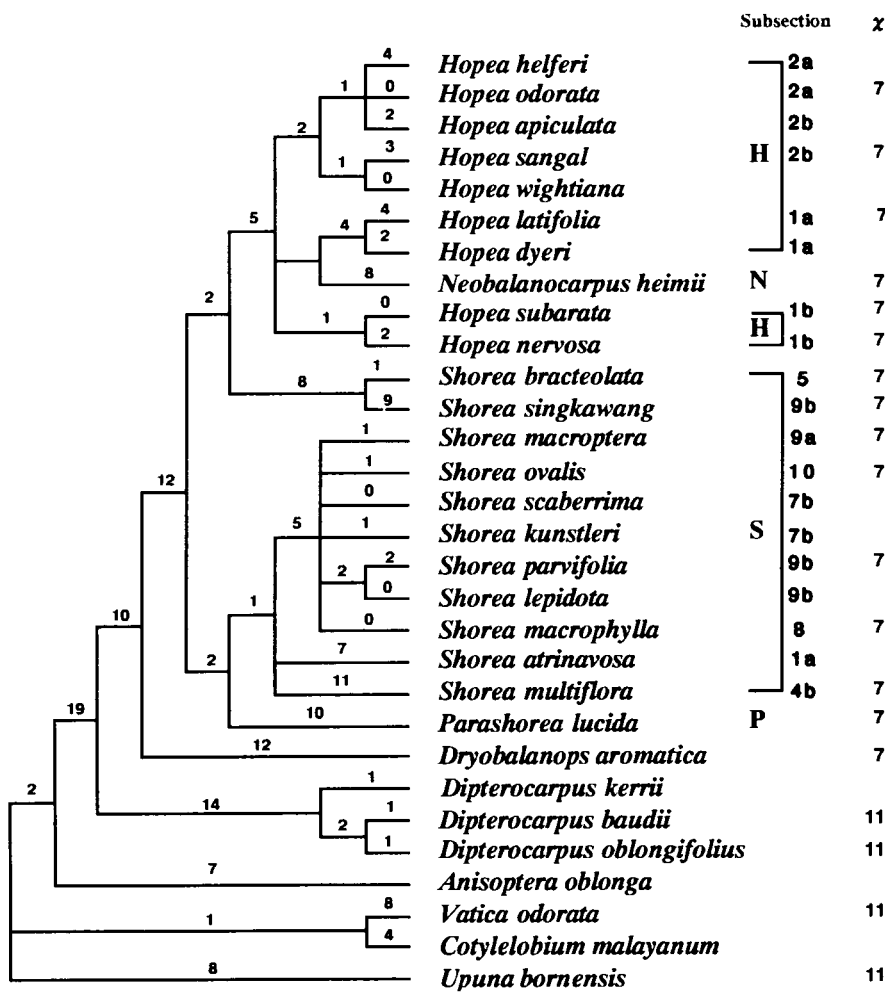


Fig. 2 Consensus tree of Wagner parsimonious trees of Dipterocarpaceae using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes.

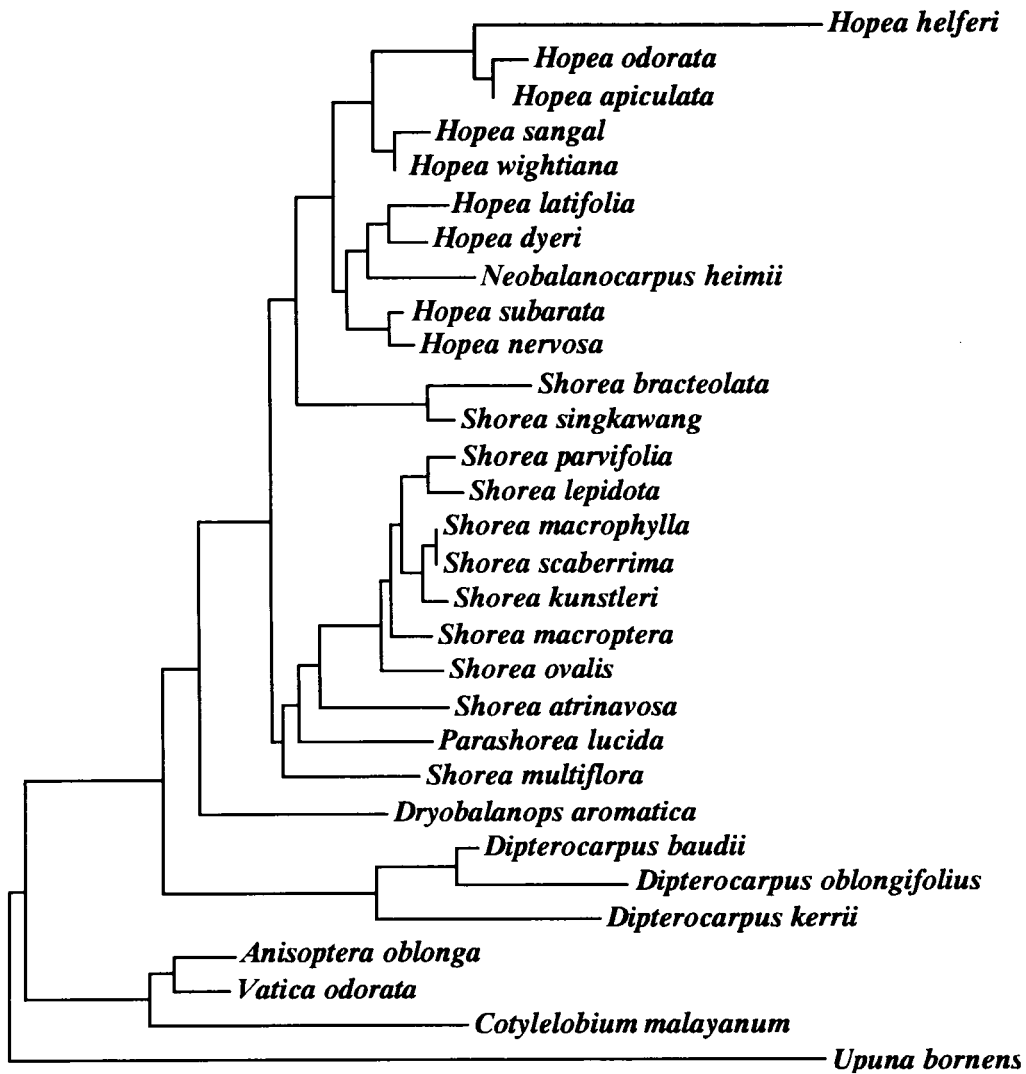


Fig. 3 NJ tree of Dipterocarpaceae using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes.

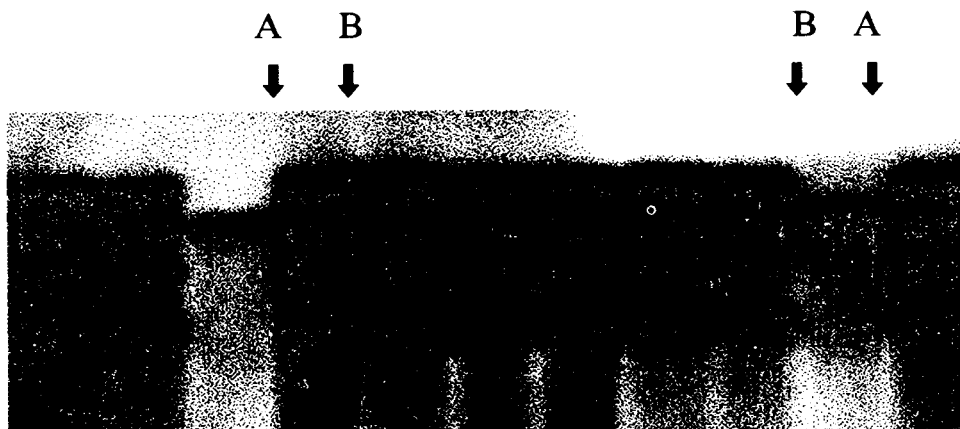


Fig. 4 Mitochondrial DNA variation of *Hopea* in combination of *coxI* and *HindIII*.

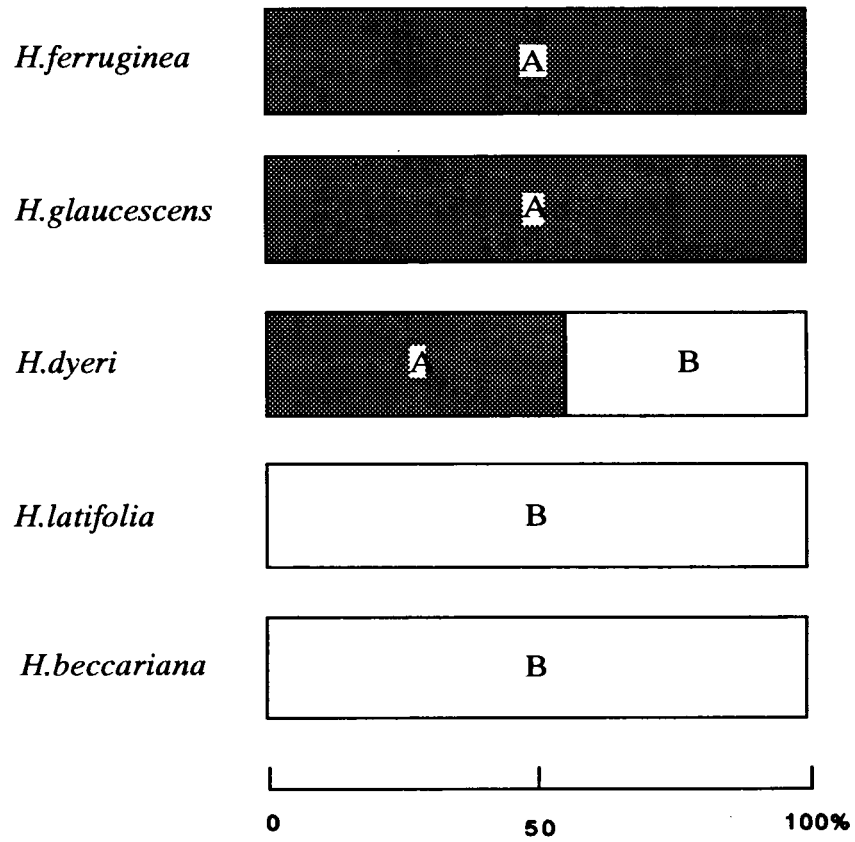


Fig. 5 Frequencies of mtDNA variation of 5 *Hopea* species.

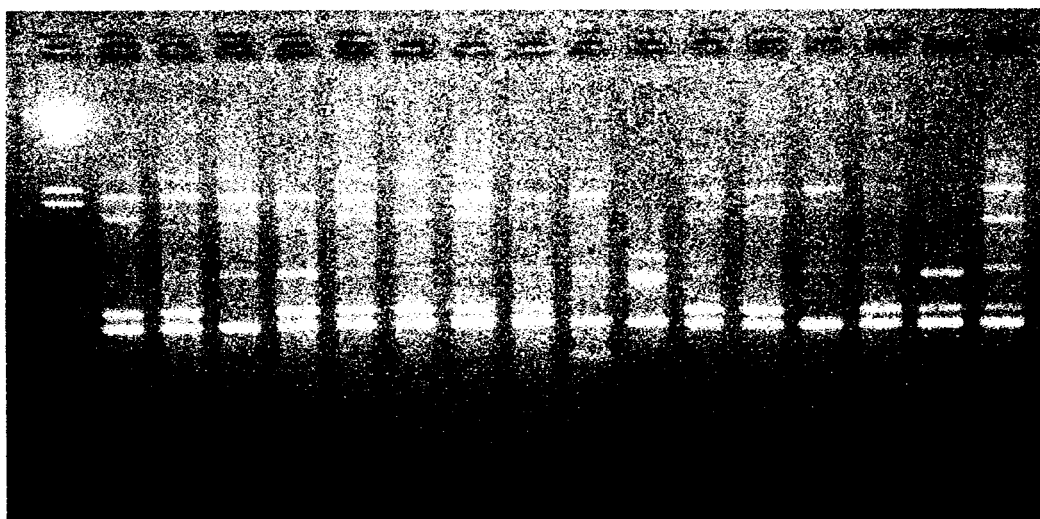


Fig. 6 RAPD pattern of *H. dyeri* population with OPK8 primer.

Table 1. Primers, fragment sizes and sources of information for amplification by PCR of eleven specific genes in chloroplast DNA.

Gene	Primers (forward and reverse)	Size	Source
<i>rbcL</i>	5'-TGTCACCAAAAACAGAGACT-3' 5'-TTCCATACTTCACAAGCAGC-3'	1,387 bp	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Hipkins et al. 1990)
<i>rpoB</i>	5'-CTAAGGGGTTGTTGTGTAAC-3' 5'-AATATGCAACGTCAAGCAGT-3'	1,286 bp	<i>Nicotiana tabacum</i> (Shinozaki et al. 1986)
<i>petB</i>	5'-TGGGGAAGTACTCCTTTGAT-3' 5'-CCCGAAATACCTTGCTTACG-3'	1,634 bp	<i>Nicotiana tabacum</i> (Shinozaki et al. 1986)
<i>psbA</i>	5'-TACGTTCGTGCATAACTTCC-3' 5'-CTAGCACTGAAAACCGTCTT-3'	939 bp	<i>Pinus contorta</i> (Lidholm and Gustafsson 1991)
<i>psbD</i>	5'-TATGACTATAGCCCTTGGTA-3' 5'-TAGAACCTCCTCAGGGAATA-3'	1,042 bp	<i>Nicotiana tabacum</i> (Shinozaki et al. 1986)
<i>atpH</i> (<i>atpH-atpI</i>)	5'-TTGACCAACTCCAGGTCCAA-3' 5'-CCGCAGCTTATATAGGCGAA-3'	1,283 bp	<i>Spinacia oleracea</i> (Henning and Herrmann 1986)
16S	5'-ACGGGTGAGTAACGCGTAAG-3' 5'-CTTCCAGTACGGCTACCTTG-3'	1,375 bp	<i>Nicotiana tabacum</i> (Shinozaki et al. 1986)
<i>rpoC</i> (<i>rpoC1-rpoC2</i>)	5'-GCAGTTTCTTGAAAACCTCGC-3' 5'-TGTACACGCGGTAGAAAAAT-3'	3,603 bp	<i>Nicotiana tabacum</i> (Shinozaki et al. 1986)
<i>psaA</i>	5'-AAGAATGCCCATGTTGTGGC-3' 5'-TTCGTTCGCCGGAACCAGAA-3'	2,218 bp	<i>Nicotiana tabacum</i> (Shinozaki et al. 1986)
<i>petA</i>	5'-TATGAAAATCCACGAGAAGC-3' 5'-TATCAGCAATGCAGTTCATC-3'	2,314 bp	<i>Nicotiana tabacum</i> (Shinozaki et al. 1986)
<i>trnK</i>	5'-AACCCGGAAGTACTCGGATG-3' 5'-TCAATGGTAGAGTACTCGGC-3'	2,569 bp	<i>Oryza sativa</i> (Hiratsuka et al. 1989)

Table 2. The mean estimates of nucleotide substitutions (%), the corresponding standard deviations, site change between species, surveyed sequence and sizes of amplified fragments for each gene.

Gene	Fragment size	Site change	Surveyed sequencea (%)	Nucleotide substitution	S.D.
<i>rbcL</i>	1387 bp	15	143 bp (10.3%)	4.05	0.0229
<i>rpoB</i>	1286 bp	17	124 bp (9.6%)	3.09	0.0197
<i>petB</i>	1634 bp	23	133 bp (8.1%)	6.22	0.0476
<i>psbA</i>	939 bp	3	79 bp (8.4%)	6.48	0.0096
<i>psbD</i>	1042 bp	8	85 bp (8.2%)	3.11	0.0254
<i>atpH</i>	385 bp	3	24 bp (6.2%)	6.21	0.0682
16S	1375 bp	6	78 bp (5.7%)	1.87	0.0176
<i>rpoC</i>	3603 bp	33	220 bp (6.1%)	4.21	0.0321
<i>psaA</i>	2218 bp	8	86 bp (3.9%)	4.05	0.0237
<i>petA</i>	2314 bp	8	46 bp (2.0%)	8.57	0.0790
<i>trnK</i>	2569 bp	17	108 bp (4.2%)	6.83	0.0390
Total	18752 bp	141	1126 bp (6.0%)	3.83	0.0627

Table 3 Investigated mother trees and their seedlings.

No.	Mother tree	No. of seedling	Reference*
1	Mother tree 1	35	---
2	Mother tree 2	24	25A
3	Mother tree 3	15	173
4	Mother tree 4	20	40

*: Identification number in Pasoh Research Plot.

Table 4 Estimated value of outcrossing rate of *Neobalanocarpus heimii*

Method	Number of locus	Outcrossing rate	S.D.
Multilocus	5	1.065	0.212
Singlelocus	5	1.005	0.052
Multi - Single		0.060	0.206

Table 5. Materials for genetic diversity of *Hopea* using mtDNA variation.

Species	Location	Individual No.
<i>H. odorata</i>	Kampung Chap, Kelantan	13
	Kuala Kangsar, Perak	13
	Tumpat, Kelantan	31
	Bukit Ajil, Terengganu	29
<i>H. dyeri</i>	Sungai Nipah F.R., Terengganu	6
	Bukit Enggang, Terengganu	24
	Teloi F.R., Terengganu	22
<i>H. ferruginea</i>	Sungai Nipah, Terengganu	24
<i>H. latifolia</i>	Kledang Sayong, Perak	32
<i>H. beccariana</i>	Gunong Bongsu, Kedah	33
<i>H. glaucescens</i>	Bukit Wang, Perak	8
<i>H. myrtifolia</i>	Gunong Jerai F.R., Kedah	9

Table 6. The locations of *Hopea* populations to be analyzed using RAPD

Species	Site	Location	# of samples
<i>H. dyeri</i>	Bukit Enggang, (Kedah)	05° 50'N 100° 44'E	24
<i>H. dyeri</i>	Rimba Teloi, (Kedah)	05° 52'N 100° 49'E	21
<i>H. ferruginea</i>	Sungai Nipah, (Terengganu)	04° 18'N 103° 10'E	20
<i>H. glaucescens</i>	Kledang Sayong, (Perak)	04° 42'N 101° 02'E	8
<i>H. myrtifolia</i>	Gunung Bongsu, (Perak)	05° 24'N 100° 42'E	10
<i>H. myrtifolia</i>	Sungai Bikam, (Perak)	03° 50'N 101° 15'E	23
<i>H. pierrei</i>	Gombak, (Selangor)	03° 18'N 101° 49'E	7

Table 7. Nucleotide sequences of Operon random primers

Primer	Sequence	Primer	Sequence
A09	5'-GGGTAACGCC-3'	E07	5'-AGATGCAGCC-3'
A10	5'-GTGATCGCAG-3'	F02	5'-GAGGATCCCT-3'
A13	5'-CAGCACCCAC-3'	F07	5'-CCGATATCCC-3'
A18	5'-AGGTGACCGT-3'	F13	5'-GGCTGCAGAA-3'
B08	5'-GTCCACACGG-3'	F16	5'-GGAGTACTGG-3'
B11	5'-GTAGACCCGT-3'	H05	5'-AGTCGTCCCC-3'
D18	5'-GAGAGCCAAC-3'	J13	5'-CCACACTACC-3'

Table 8. Estimates of the average number of nucleotide substitutions within and between *Hopea* populations.

	d-B	d-R	f-S	g-K	m-G	m-S	p-G
d-B	0.0120 ± 0.0025						
d-R	0.0238 ± 0.0047	0.0096 ± 0.0014					
f-S	0.0276 ± 0.0052	0.0293 ± 0.0060	0.0152 ± 0.0029				
g-K	0.0274 ± 0.0060	0.0302 ± 0.0065	0.0225 ± 0.0046	0.0083 ± 0.0018			
m-G	0.0235 ± 0.0049	0.0332 ± 0.0058	0.0313 ± 0.0072	0.0308 ± 0.0065	0.0056 ± 0.0013		
m-S	0.0312 ± 0.0061	0.0330 ± 0.0068	0.0266 ± 0.0049	0.0153 ± 0.0031	0.0309 ± 0.0053	0.0103 ± 0.0022	
p-G	0.0285 ± 0.0068	0.0303 ± 0.0076	0.0285 ± 0.0060	0.0240 ± 0.0064	0.0335 ± 0.0074	0.0215 ± 0.0059	0.0115 ± 0.0034

d-B: *H. dyeri* in Bukit Enggang. d-R: *H. dyeri* in Rimba Teloi. f-S: *H. ferruginea* in Sungai Nipah. g-K: *H. glaucescens* in Kledang Sayong. m-G: *H. myrtifolia* in Gunung Bongsu.

m-S: *H. myrtifolia* in Sungai Bikam. p-G: *H. pierrei* in Gombak.

The figures on the diagonal refer to the average number of nucleotide substitutions within populations and those below the diagonal represent between populations. The values following ± are standard deviations.

Table 9. Interspecific genetic divergence between five *Hopea* species

	<i>H dyeri</i>	<i>H ferruginea</i>	<i>H glaucescens</i>	<i>H myrtifolia</i>
<i>H ferruginea</i>	0.0155			
<i>H glaucescens</i>	0.0193	0.0108		
<i>H myrtifolia</i>	0.0209	0.0174	0.0149	
<i>H pierrei</i>	0.0173	0.0151	0.0141	0.0178