

# SCHLUSSBERICHT

## Titel des Projektes

**Die Eignung molekulargenetischer Marker zur Identifikation der örtlichen Holzherkunft bei Baumarten der Tropen (03HS047)**

## Forschungseinrichtung

**Georg-August-Universität Göttingen**  
**Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie**  
**Büsgen-Institut**  
**Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung**

## Projektteam

### Projektleiter:

Prof. Dr. Reiner Finkeldey, Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Tel: 0551-393536.

### Beteiligte Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler:

Aus Eigenmitteln finanziert: Dr. Oliver Gailing, Dr. Ludger Leinemann

Aus diesem Projekt finanziert: Yanti Rachmayanti (Doktorandin)

Aus anderen Drittmitteln finanziert: Dr. Cuiping Cao (DFG)

Stipendiatinnen und Stipendiaten (DAAD): Dr. Sapto Indrioko, Phi Nga Nguyen, Hani Nuroniah

### Technische Mitarbeiterinnen:

Aus diesem Projekt finanziert: Frau Alexandra Dolynska, Frau Olga Artes

## 1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Der internationale Handel mit Holz und Holzprodukten ist ein bedeutsamer Aspekt der wirtschaftlichen Beziehungen zwischen industrialisierten Ländern und Entwicklungsländern, trägt aber auch zur Zerstörung tropischer Wälder mit zahlreichen negativen Folgewirkungen bei. Methoden zur **Kontrolle des Handels** und insbesondere zur **Erkennung illegal eingeschlagenen oder falsch deklarierten Holzes** können daher zur Walderhaltung gerade in den Tropen beitragen. Projektziel war es, molekulargenetische Methoden zu entwickeln und zu verfeinern, die es erlauben, mit minimalem Aufwand Aussagen über die Herkunft von Holz und Holzprodukten zu treffen. Die entwickelten Methoden sollten je nach geforderter Genauigkeit bis hin zur Gerichtsfestigkeit eingesetzt werden können. Beispielhaft sollte ein objektiv nachvollziehbares Entscheidungssystem etabliert werden, welches eine Aussage darüber zulässt, ob eine fragliche Probe aus einer bestimmten Region oder sogar einem bestimmten Betrieb kommen kann. Ein entsprechendes System sollte zunächst für die bedeutsame Baumfamilie *Dipterocarpaceae* etabliert werden. Die Übertragbarkeit auf andere wichtige, international gehandelte Arten sollte überprüft werden, und es sollten Vorschläge für die praktische Durchführung eines Kontrollsystems entwickelt werden.

Die Erkennung des Holzes sollte mittels molekulargenetischer Marker erfolgen. Methoden der Untersuchung von genetischen Markern nach Extraktion von DNA sind für Baumarten der gemäßigten Breiten noch in der Entwicklung und waren für tropische Baumarten bei Projektbeginn noch nahezu völlig unerforscht.

Die Baumfamilie *Dipterocarpaceae* stand im Zentrum der Untersuchung, da sie die Wälder Südostasiens, also einer der drei wichtigsten Regionen der Tropen, dominiert und da die bei

weitem wichtigsten Hölzer für den Holzmarkt in Südostasien und den Export von dort in andere Regionen von Dipterocarpaceen-Arten gewonnen werden.

Folgende wichtige wissenschaftliche und technische Arbeitsziele wurden, wie im Projektangebot beschrieben, verfolgt:

- Gewinnung von für eine Untersuchung geeignetem **Material** (insbesondere Holzproben; siehe Abschnitte 1.1.1 und 2.1)
- Etablierung von Methoden zur **Extraktion von DNA** aus dem Holz von Dipterocarpaceen in für weitere Untersuchungen hinreichender Quantität und Qualität (siehe Abschnitte 1.1.2 und 3.1.1)
- Etablierung geeigneter **DNA-Marker**, die eine Differenzierung von Arten und Herkunftsregionen erlauben (PCR-RFLPs, Sequenzierungen, cpSSRs, AFLPs, SCARs) (siehe Abschnitte 1.1.3 sowie 3.1.2 und 3.1.3)
- Etablierung eines **Entscheidungssystems** zur Erkennung der örtlichen Holzherkunft bei Dipterocarpaceen durch Unterscheidung von Arten und / oder Provenienzen (siehe Abschnitt 1.1.4)
- Test der grundsätzlichen **Übertragbarkeit** der Resultate auch auf andere tropische Baumarten oder Artengruppen (siehe Abschnitt 1.1.5)

### **1.1 Planung und Ablauf des Projektes**

Das Projekt wurde in inhaltlich klar voneinander abgegrenzte Teilabschnitte untergliedert, die sich aus den bereits angegebenen Projektzielen ergaben. Die Arbeiten an diesen Teilabschnitten wurden teilweise parallel oder zeitlich überlappend durchgeführt.

#### **1.1.1 Gewinnung von Untersuchungsmaterial**

Als Ausgangsmaterial für die Extraktion von DNA wurde sowohl Holz als auch Blattmaterial verwendet. Aufgrund der großen Anzahl untersuchter Proben (siehe Abschnitt 2.1) war es weder sinnvoll noch praktikabel, DNA aus Holz von allen Proben zu extrahieren.

Die Analyse räumlicher Verteilungsmuster genetischer Variation basierte auf einer großen Zahl von Proben, bei denen weit überwiegend die Extraktion der DNA aus Blättern erfolgte. Dies erscheint aufgrund der klaren Trennung der Teilaspekte Optimierung von DNA-Extraktion aus Holz sowie Etablierung informativer Marker naheliegend und wird auch für Folgeuntersuchungen bei Dipterocarpaceen und anderen Baumarten empfohlen.

Holz wurde im geplanten Umfang mit lokalen Partnern aus den Herkunftsländern Indonesien, Philippinen, Vietnam und Thailand geerntet. Trotz intensiver Bemühungen und enger, seit vielen Jahren aufgebauter Kontakte gelang es aber nicht, wie vorgesehen auch Material aus Burma (Myanmar) in die Untersuchung einzubeziehen. Zwar sagte das für die Erteilung einer Ausfuhrgenehmigung von Holz auch in extrem geringen Mengen zuständige Forstministerium zu, das Projekt zu unterstützen, letztlich wurde aber keine Genehmigung zur Ausfuhr erteilt. Die schlechten politischen Beziehungen und ein geringes Interesse an der Etablierung von Methoden, die Transparenz in den internationalen Handel mit Tropenholz bringen können, sind vermutlich die Hauptgründe dafür, dass letztlich kein Material aus Burma untersucht werden konnte. Dies ist unglücklich, da illegaler Holzeinschlag und nicht nachhaltige Nutzung von Wäldern in Burma weit verbreitet sind und so zu einem dramatischen Rückgang der Waldfläche führen.

Diese Erfahrungen belegen zum einen, dass staatliche und nicht-staatliche Institutionen, die kein Interesse an der Etablierung von effektiven Kontrollmechanismen für den Handel mit Tropenholz haben, entsprechende Bemühungen substanziell dadurch stören können, dass sie die Beerntung von Referenzproben unmöglich machen. Zum anderen wird an dem Beispiel der Beerntung von Holz in anderen Ländern deutlich, dass eine frühe Einbindung von Partnern in den betreffenden Herkunftsländern unerlässlich ist, um ein effektives Kontrollsystem zu etablieren.

### 1.1.2 Etablierung von Extraktionsmethoden

Die Nutzung molekulargenetischer Marker für Zwecke der Herkunftserkennung von Holz setzt ganz offensichtlich voraus, dass DNA aus Holz in einer Quantität und einer Qualität extrahiert werden kann, welche eine weitere Untersuchung ermöglicht. Da die folgenden Untersuchungsmethoden alle auf der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction; PCR*) basieren, ist die Extraktion von DNA aus Holz so zu optimieren, dass eine folgende PCR erfolgreich durchgeführt werden kann.

Ein praxistaugliches Verfahren soll möglichst einfach sein, damit es in vielen Laboren routinemäßig genutzt werden kann. Zudem soll es möglichst kostengünstig sein, damit eine Nutzung der etablierten Verfahren nicht an zu hohen Unkosten scheitert. Es wurden daher nur solche Verfahren der Extraktion verglichen und optimiert, die ohne sehr teure Zusatzgeräte und ohne einen Hochreinheitsraum, also in üblichen, gut ausgestatteten molekulargenetischen Laboren durchgeführt werden können. Das für die Extraktion von DNA aus dem Holz von Dipterocarpaceen empfohlene Protokoll wird ausführlich in Rachmayanti et al. (2006 und in press) beschrieben (siehe auch Abschnitt 2.2).

### 1.1.3 Etablierung differenzierender DNA-Marker

Die Dipterocarpaceen sind eine extrem diverse Baumfamilie mit über 480 Arten. International gehandelt werden ausschließlich Arten aus dem Zentrum der Diversität in Asien. Hunderte der über 400 asiatischen Arten werden genutzt und dürften auch international gehandelt werden. Diese werden zu wenigen Artengruppen mit unklarer taxonomischer Bedeutung (z.B. *yellow meranti*, *dark red meranti*, *light red meranti*, etc. für verschiedene *Shorea*-Arten) zusammengefasst. Hinter diesen Gruppen verbergen sich oft dutzende botanischer Arten, die mittels gewöhnlicher holzanatomischer Untersuchungen nicht differenziert werden können.

Viele botanische Arten sind endemisch, treten also nur in einem kleinen Verbreitungsgebiet auf. Diese Arten gelten oft als gefährdet, so dass Möglichkeiten zu ihrer Erkennung mittels molekularer Methoden unter dem Aspekt des Artenschutzes besonders bedeutsam sind. Bei diesen endemischen Arten wird durch ihre Erkennung mittels molekularer Methoden das mögliche Ursprungsgebiet des Holzes auf ihr Verbreitungsgebiet verkleinert. Es kann bei den Dipterocarpaceen daher in vielen Fällen bereits durch die Arterkennung eine fehlerhafte Angabe über die Herkunft des Holzes eindeutig als falsch erkannt werden.

#### 1.1.3.1 Artunterscheidung

In einem ersten Ansatz erfolgte die Unterscheidung von Arten der Dipterocarpaceen mittels der PCR-RFLP und der cpSSR Technik (Indrioko et al., 2006). Der regionale Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag in Indonesien (siehe Abschnitt 2.3). Untersuchungen zur Artunterscheidung wurden einerseits durch Erweiterung der Untersuchungsregionen und des Artenspektrums ausgeweitet; so entstand an der Abteilung eine M.Sc. Arbeit zur Variation philippinischer Dipterocarpaceen (Villarin, 2007) auf der Basis der bei Indrioko (2006) beschriebenen Methoden. Andererseits erfolgte eine Verfeinerung der Ergebnisse durch Sequenzierung ausgewählter Fragmente der cpDNA und der ITS Region (Rachmayanti (in prep.) für den Tribus Shoreae; Nguyen (in prep.; Nguyen et al., 2008 für den Tribus Dipterocarpaceae) sowie Vergleiche dieser Sequenzen mit Datenbank-Sequenzen. Zudem wurden die durch Untersuchung von cpDNA-Polymorphismen aufgestellten molekularen Phylogenien mit der Variation von AFLPs verglichen (Cao et al., 2006a).

#### 1.1.3.2 Intraspezifische Variation

Innerartliche Variation wurde insbesondere bei den zwei in Indonesien häufigsten Dipterocarpaceen-Arten *Shorea leprosula* und *S. parvifolia* untersucht. Erste Bemühungen zur Unterscheidung von Herkunftsregionen basierten auf der Untersuchung von cpDNA. Nachdem hier kaum für den Zweck der Herkunftsidentifikation nutzbare Variation beobachtet wurde (siehe Abschnitt 3.1.3), andererseits aber hohe Variation bei anonymen AFLPs vorlag (Cao et al.,

2006b), konnten ausgewählte, informative AFLP-Banden in SCAR (*sequence characterized amplified regions*) Marker umgewandelt werden (Nuroniah, in prep.; Nuroniah et al., 2008).

#### 1.1.4 Etablierung eines Entscheidungssystems

Basierend auf den Ergebnissen der Artunterscheidung (siehe Abschnitt 1.1.3.1) war es vergleichsweise einfach möglich, ein System zu etablieren, welches die Bestimmung der Art erlaubt. Sehr seltene, noch nicht in die Untersuchung einbezogene Arten konnten nicht in dieses System aufgenommen werden. In vielen Fällen ist es möglich, die Art aufgrund eines einzigen, differenzierenden Merkmals zweifelsfrei zu erkennen. In anderen Fällen ergibt sich die Erkennung der Art aus einer charakteristischen Kombination von Merkmalen.

Die Unterscheidung von verschiedenen Herkünften einer Art erwies sich demgegenüber als wesentlich schwerer (siehe Abschnitt 1.1.3.2). Für einzelne Arten wurden hier jedoch auf der Basis komplexer „genetischer Fingerabdrücke“ (AFLPs) zunächst beispielhaft die Möglichkeiten der Erkennung von Herkünften gezeigt.

Das Entscheidungssystem ist in zweifacher Hinsicht offen für Erweiterungen: Zum einen durch Untersuchung weiteren Materials, also neuer Arten oder Herkünfte, und zum anderen durch die Möglichkeit, methodische Neuerungen, insbesondere auch Informationen über DNA-Sequenzen, in das System einzupflegen.

#### 1.1.5 Test der Übertragbarkeit von Methoden

Test zur Übertragbarkeit von Methoden wurden nur für die etablierten Protokolle zur Extraktion von DNA aus Holz durchgeführt, da die Analyse von Variationsmustern definitionsgemäß art- oder artengruppenspezifisch ist und daher eine Übertragung nicht möglich ist. Für viele Baumarten der Tropen ließen sich aber vermutlich durch eine ähnliche Kombination der für die Dipterocarpaceen entwickelten Methoden (cpSSRs, AFLPs, PCR-RFLPs, SCAR Marker, DNA Sequenzen) ebenfalls aussagekräftige Ergebnisse erzielen.

Die Tests zur Übertragbarkeit der DNA-Extraktionsmethode wurden mit Holz unterschiedlicher Baumarten der Tropen und, aus Vergleichsgründen, auch der gemäßigten Breiten durchgeführt.

### 1.2 *Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde*

Der wissenschaftliche und technische Stand zu Beginn des Projektes wurde bereits im Projektantrag kurz erläutert. Grundsätzlich waren bei Projektbeginn Möglichkeiten zur Extraktion von DNA aus Holz bekannt; diese Untersuchungen wurden jedoch nicht bei Baumarten der Tropen durchgeführt. Ebenso waren alle der eingesetzten molekularen Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung von DNA-Polymorphismen bereits zu Projektbeginn beschrieben (PCR-RFLPs; cpSSRs, AFLPs, SCARs, Sequenzen). Es lagen allerdings nur wenige Ergebnisse zur zwischenartlichen und innerartlichen Variation von Dipterocarpaceen vor.

Der folgende Untersuchungsansatz wurde verfolgt: Die Basis für die Erkennung der örtlichen Holzherkunft ist die Beobachtung von Merkmalen am Holz beziehungsweise an Holzprodukten, die eindeutige Unterschiede zwischen verschiedenen Herkunftsregionen zeigen. Zu diesem Zweck ist zunächst die **räumliche Differenzierung zwischen den Herkunftsregionen** an verschiedenen Merkmalen zu betrachten. Nur solche Merkmale eignen sich, die reproduzierbare Unterschiede zwischen „Holzherkünften“ erkennen lassen. Diese Unterschiede können sich auf verschiedenen räumlichen Skalen erkennen lassen. Anschließend oder direkt damit verbunden sind dann Methoden zu entwickeln, die die Beobachtung solcher „differenzierender Merkmale“ an Holz und nach Möglichkeit auch an Holzprodukten erlauben. Relevante Forschungsaktivitäten können somit einem der folgenden Gebiete zugeordnet werden:

- (1) Erkennung „differenzierender Merkmale“ (vgl. Abschnitte 1.1.3 und 3.1.1)
- (2) Etablierung von Methoden zur Beobachtung „differenzierender Merkmale“ an Holz und Holzprodukten (vgl. Abschnitte 1.1.2, 3.1.2 und 3.1.3)

Im Projekt sollten zunächst **molekulargenetische Merkmale** etabliert werden, die sich eignen, um zur Herkunftsidentifikation von Holz eingesetzt zu werden. Molekulargenetische Ansätze zur Beobachtung differenzierender Merkmale verdienen besondere Beachtung, da genetische Differenzierung keinem Einfluss der Umwelt unterliegt und sich in diskret variierenden Merkmalsausprägungen manifestiert, so dass nicht überlappende Klassen unterschieden werden können. Damit sind genetisch differenzierende Merkmale hochgradig resistent gegenüber Manipulationsversuchen. Gerade bei Waldbäumen zeigte sich allerdings, dass die Mehrzahl genetischer Merkmale vorwiegend innerhalb von Populationen variiert, dass also Unterschiede zwischen Populationen oder „Herkünften“ nur gering sind (Hamrick and Godt 1996). Ermutigend waren allerdings Untersuchungen der Variation uniparental vererbter DNA bei diversen Baumarten. Insbesondere maternal, also nur über den Samenelter vererbte DNA aus Chloroplasten (cpDNA) und Mitochondrien (mtDNA), variiert häufig vorwiegend zwischen Populationen, Regionen, und Herkünften. Diese bei anderen Baumarten der gemäßigten Breiten und der Tropen gemachten Beobachtungen konnten allerdings für die Dipterocarpaceen nicht bestätigt werden. Bei der Mehrzahl der diesbezüglich untersuchten Arten wurde im Verlauf dieser Untersuchung festgestellt, dass cpDNA nur wenig variabel ist und innerhalb einer Art kaum zur Erkennung regionaler Unterschiede genutzt werden kann.

Neuere Untersuchungen belegen, dass molekulargenetische Marker etabliert werden können, die die erwünschte, starke Differenzierung zwischen „Herkünften“ oder sehr nahe verwandten Arten, die anhand holzanatomischer Merkmale kaum unterschieden werden können, zeigen (Petit *et al.* 2002). Auch bei tropischen Waldbäumen liegen diesbezüglich erste Ergebnisse vor (Hamilton 1999; Cavers *et al.* 2003).

Die Beobachtung molekulargenetischer Merkmale an Holz oder Holzprodukten setzt die **Extraktion von DNA** aus diesen Materialien voraus. Auch in diesem Bereich wurden bereits vor Projektbeginn ermutigende Erfolge erzielt (Dumolin-Lapègue *et al.* 1999). Es wurden routinemäßig einsetzbare Verfahren zur Extraktion von DNA aus Holz (Deguilloux *et al.* 2002) und anderen verholzten Geweben, beispielsweise dem stark verholzten Endokarp von Steinfrüchten (z.B. Kirschkernen) etabliert (Godoy and Jordano 2001). Die Qualität der aus holzigen Geweben extrahierten DNA lässt vielfach direkt oder nach einem einfachen Reinigungsschritt die Amplifikation bestimmter Bereiche des Genoms mittels PCR zu.

Das gegenwärtig wohl am weitesten fortgeschrittene Verfahren zur Bestimmung des Ursprungs von Holz mittels molekulargenetischer Methoden wurde bei europäischen Eichenarten (*Quercus* spp.) entwickelt. Es basiert auf einer detaillierten, europaweiten **Inventur der cpDNA** bei europäischen Eichen und der Möglichkeit, DNA aus Eichenholz zu extrahieren (Deguilloux *et al.* 2002; Deguilloux *et al.*, 2003). Durch diese Arbeiten ist die Möglichkeit, cpDNA auch aus Holz zu extrahieren und zu untersuchen, zweifelsfrei belegt, da die entsprechende DNA sich nicht nur in den Blättern, sondern auch in den Zellen des Holzes findet.

## **2. Material und Methoden**

Wesentliche Resultate dieses Projektes liegen bereits in der Form von Publikationen vor, die diesem Bericht als Anlagen beigefügt sind. Diese Publikationen stellen das untersuchte Material und die genutzten Methoden ebenso ausführlich dar wie die Ergebnisse. In diesem Bericht wird daher in den Kapitel 2 und 3 auf die entsprechenden Publikationen verwiesen, soweit dies sinnvoll ist.

### **2.1 Material**

Da es weder sinnvoll noch möglich war, Material aller untersuchter Pflanzen als Holz- und Blattproben zu untersuchen, erfolgte die Optimierung von Methoden zur Extraktion von DNA (Abschnitt 1.1.2) getrennt von den Arbeiten zur Etablierung räumlich differenzierender Marker (Abschnitt 1.1.3).

## 2.1.1 Holzproben

Insgesamt wurde DNA aus 332 Proben unterschiedlicher Dipterocarpaceen extrahiert (Tabelle 1). Material konnte wie vorgesehen aus Vietnam, Indonesien, den Philippinen und Thailand von jeweils 5 unterschiedlichen Orten geerntet werden. Leider stand kein Material aus Burma für die Untersuchungen zur Verfügung (siehe Abschnitt 1.1.1). Tests zur Extraktion von DNA wurden zusätzlich mit 151 Proben aus Dipterocarpaceen-Holz nach Transport und unterschiedlicher Be- bzw. Verarbeitung durchgeführt.

Tabelle 1: Untersuchte Holzproben (aus Rachmayanti et al., in press)

Type of Sample	Qty. (N)	Species or Timber Name	Source/Regional Origin	Wood Sampling/ Tree Felling	DNA Extraction
Cross-Sectional disk of trunk	40 :	8 <i>Anisoptera costata</i>	Vietnam	Feb - May 2006	July 2006
		8 <i>Dipterocarpus alatus</i>	[4 Populations: Tay Ninh, Oong Nai, Ba		
		8 <i>Dipterocarpus intricatus</i>	Ria-Vung Tau, Binh Thuan]		
		8 <i>Hopea Odorata</i>			
		8 <i>Shorea roxburghii</i>			
Cross-Sectional disk of trunk and leaf *)	38 :	36 <i>Shorea</i> sp. (20 dif. species)	Indonesia [2 Populations in East Kalimantan, one in West Kalimantan and one in Jambi Sumatra]	Aug-Oct 2005	Jan-July 2006
		1 <i>Dipterocarpus elongatus</i>			
		1 <i>Vatica oblongivolia</i>			
Dried wood shavings	53 :	18 <i>Dipterocarpus alatus</i>	Thailand	2006	Dec 2006
		5 <i>Dipterocarpus tuberculata</i>	[5 Populations: Phuwiang khon kaen,		
		4 <i>Dipterocarpus obtusifolius</i>	Cahinmai, Suratnee, samui and		
		2 <i>Dipterocarpus turbinatus</i>	Ratchaburi]		
		2 <i>Hopea odoratus</i>			
		10 <i>Shorea obtosa</i>			
		7 <i>Shorea siamensis</i>			
		5 <i>Shorea roxburghii</i>			
Cross-Sectional disk of trunk and leaf	50 :	29 <i>Shorea</i> s p. (5 dif. species)	Philippines	3 Periods:	2 Periods:
		3 <i>Parashorea malaanoman</i>	[4 Populations: Leyte State University	Feb 2005	May 2005
		2 <i>Hopea plagata</i>	(LSU) Forest Reserve, Silago,	May-June 2006	Dec 2006
		1 <i>Hopea malibato</i>	Hinunangan, Paranas- Western-Samar]	Sept 2006	
		2 <i>Anisoptera aurea</i>			
		2 <i>Dipterocarpus kerrii</i>			
		2 <i>Dipterocarpus validus</i>			
		1 <i>Dipterocarpus grandiflorus</i>			
		1 <i>Vatica mangachapoi</i>			
		7 Dipterocarpaceae family			
Processed wood [dried saw-wood, glued wood, frames etc.]	151	Meranti	Germany [10 wood enterprises or wood processing facilities], and Indonesia [R & D Center of Forestry Department, Bogor]. Regional origin of wood is unknown	Tree felling periode is unknown	2 Periods: May 2005 and Jan 2006 - Feb 2007

In Abbildung 1 ist beispielhaft illustriert, in welcher Form Holz aus Indonesien von den dortigen Partnern in den Einschlagsgebieten geerntet wurde und für die Untersuchungen zur Verfügung stand. In Thailand, Vietnam und den Philippinen erfolgte die Beerntung von Holzproben nicht destruktiv, sondern von lebenden, stehenden Bäumen.

Die Übertragbarkeit der Methode zur Extraktion von DNA wurde für diverse Holzarten der gemäßigten Breiten und der Tropen getestet (Abschnitt 1.1.5). Insgesamt wurde für diese Tests Holz von 74 Bäumen verwendet (Tabelle 2).

Abbildung 1: Stammabschnitte indonesischer Dipterocarpaceen



Tabelle 2: Untersuchte Hölzer außer Dipterocarpaceen (nach Rachmayanti et al., in press)

Species or Timber Name	Qty. (N)	Type of Sample	Source/Regional Origin	Wood Sampling/ Tree Feeling	DNA Extraction
<i>Tectona grandis</i> / Teak	12 : 11	Dried wood shavings	Thailand [Phuwiang khon kaen & Chaingmai]	2006	Dec 2006
		Cross-section disk of trunk	Indonesia [west Java]	2006	Feb 2006
<i>Eusideroxylon zwageri</i> / Ulin / Borneo ironwood	2	Cross-section disk of trunk	Indonesia [Jambi, Sumatra]	end of 2001 - early 2002	May 2005 and Dec 2006
<i>Prunus arborea</i>	1	Cross-section disk of trunk	Indonesia [east Kalimantan]	Aug 2005	Feb 2006
<i>Strombosia ceylanica</i> Gardn	1	Cross-section disk of trunk	Indonesia [east Kalimantan]	Aug 2005	Feb 2006
<i>Triplochiton scleroxylon</i> / Obeche	7 :	oven heated saw-woods	Germany [2 wood enterprises]	unknown	Dec 2006
			Regional origin of wood:		
			Ghana,		
			Ivory Coast, and		
			Cameroun		
<i>Populus</i> sp./ Poplar :	25 :	Cross-section disk of trunk	China [Zhangye, Gansu]	unknown	July 2007
Unknown	3	wood pieces from tree trunk	Costa Rica	unknown	July 2006
<i>Pinus sylvestris</i> / Scotch Pine	12	Cross-section disk of trunk	Germany	unknown	March 2006
<i>Picea abies</i> L / Norway Spruce	8	Cross-section disk of trunk	Germany	unknown	Feb 2007
<i>Taxus baccata</i> / yew	2	wood pieces from tree trunk	Germany	unknown	June 2006
<i>Salix</i> spp.	1	piece of tree branch	Germany	unknown	April 2006

### **2.1.2 Blätter**

Insgesamt wurde für die Untersuchungen zur innerartlichen und zwischenartlichen Variation der Dipterocarpaceen Material von über 3000 Pflanzen gesammelt. Diese Pflanzen gehören 116 Arten an. Gesammelt wurde an über 40 Orten in den vier Ländern Indonesien, Thailand, Philippinen und Vietnam. Zudem stand Material einer afrikanischen Art (*Monotes kerstingii*) und Material verschiedener Arten aus Malaysia für die Untersuchungen zur Artdifferenzierung zur Verfügung, welches freundlicherweise von Prof. S. Porembski und Prof. Y. Tsumura bereitgestellt wurde.

Schwerpunkt der Sammlung war Indonesien mit über 2700 Proben. Hier wurde insbesondere in Naturwäldern auf Borneo (Kalimantan) und auf Sumatra geerntet. Da das Problem des illegalen Holzeinschlags in diesen Regionen besonders bedeutsam ist, entsprach dieser Schwerpunkt der Bedeutung der Region.

Eine gemeinsame Analyse und Auswertung aller Proben, die mit unterschiedlichen Methoden analysiert wurden, war weder geplant noch wäre dies sinnvoll. Das Material wird daher in den einzelnen Untersuchungen zur Analyse zwischenartlicher (siehe Abschnitt 2.3 und darin zitierte Literatur) und innerartlicher (siehe Abschnitt 2.4 und darin zitierte Literatur) Variationsmuster jeweils im Detail beschrieben.

### **2.2 DNA-Extraktion**

Verschiedene Methoden zur Extraktion von DNA aus dem Holz von Dipterocarpaceen und anderen Baumarten wurden verglichen. Eine einfache, zuverlässige Methode wurde etabliert und in der Fachzeitschrift *Plant Molecular Biology Reporter* veröffentlicht (Rachmayanti et al., 2006). Methoden zur Untersuchung der mit dieser Methode erreichbaren Erfolge werden in einem weiteren im Druck befindlichen Manuskript (Rachmayanti et al., in press) beschrieben.

### **2.3 Artunterscheidung und molekulare Phylogenien**

Untersuchungen zur zwischenartlichen Variation der cpDNA wurden zunächst mit der PCR-RFLP und der cpSSR-Methode durchgeführt (Indrioko 2006; Indrioko et al., 2006; Villarin 2007). Anschließend wurden Sequenzvergleiche sowohl für den Tribus *Shoreae* (Rachmayanti, in prep.) als auch für den Tribus *Dipterocarpaceae* (Nguyen, 2008; Nguyen, in prep.) durchgeführt. Betrachtet wurden bis zu drei sequenzierte Chloroplasten-Regionen: *trnL*-Intron, *trnL-trnF* intergenic spacer, und *petD*. Methoden zur Artunterscheidung, zur Identifikation diagnostischer Marker und zur Erstellung molekularer Phylogenien sind bei Indrioko (2006), Indrioko et al. (2006) und Nguyen et al. (2008; Nguyen in prep.) beschrieben. Die Unterscheidung von Arten und ein artübergreifender Vergleich genetischer Differenzierungsmuster an AFLPs im Vergleich zu molekularen Phylogenien auf der Basis von Variation der cpDNA werden in Cao et al. (2006a) beschrieben.

### **2.4 Innerartliche Variationsmuster**

Erste Untersuchungen zur innerartlichen Variation wurden, basierend auf cpDNA Untersuchungen, von Indrioko (2006) mittels der PCR-RFLP Methode und der Analyse von cpSSRs durchgeführt. Wesentlich umfangreichere Untersuchungen folgten basierend auf der Analyse hoch variabler AFLP-„Fingerabdrücke“ für ausgewählte Arten der Gattung *Shorea* (Cao, 2006; Cao et al., in press). Die beiden weit verbreiteten, in Indonesien häufigen Arten *S. leprosula* und *S. parvifolia* wurden am intensivsten mit der AFLP-Technik analysiert (Cao et al., 2006b). Stark differenzierende AFLP Marker wurden sequenziert und in SCAR-Marker umgewandelt (Nuroniah et al., 2008; Nuroniah, in prep.).



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die Ergebnisse des Projektes wurden ausführlich in anonym begutachteten wissenschaftlichen Zeitschriften, als Dissertationen, in Fachbüchern sowie als Poster auf Fachtagungen beschrieben (siehe Abschnitt 6.1). Weitere wissenschaftliche Artikel sind eingereicht oder in Vorbereitung. Die Dissertation von Frau Rachmayanti (in prep.) sowie von zwei vom Deutschen Akademischen Austauschdienst durch Stipendien unterstützte Promotionen sollen spätestens Anfang 2009 fertiggestellt werden (Nguyen in prep.; Nuroniah in prep.).

Die in diesen Veröffentlichungen ausführlich dargestellten Ergebnisse werden hier nur kurz zusammengefasst. Es wird auf die entsprechenden Anlagen zu diesem Schlussbericht verwiesen, da eine nochmalige Darstellung bereits publizierter Ergebnisse in diesem Bericht nicht sinnvoll ist.

##### 3.1.1 DNA Extraktion

Eine einfache und zuverlässige Methode zur Extraktion von DNA aus dem Holz von Dipterocarpaceen wurde entwickelt und von Rachmayanti et al. (2006) publiziert. Dieses Kernstück der geplanten Arbeiten konnte damit erfolgreich abgeschlossen werden.

Die Methode erlaubt verschiedene Modifikationen zur Maximierung des Erfolges einer Extraktion von DNA aus Holz. Diese Modifikationen und eine ausführliche Untersuchung der Erfolgsquoten und der Bedingungen, die den Erfolg bestimmen, sind in einem weiteren Manuskript (Rachmayanti et al., in press) dargestellt. Die Publikation dieses wichtigen Teilziels in zwei internationalen, anonym begutachteten Zeitschriften belegt die wissenschaftliche Bedeutung dieses Teils der Untersuchung und stellt sicher, dass künftige Untersuchungen diese Arbeiten als Basis verwenden können. Es wurde in der zweiten Arbeit (Rachmayanti et al., in press) zudem gezeigt, dass die Methode nicht nur bei Dipterocarpaceen, sondern auch bei fast allen anderen Hölzern (siehe Tabelle 2) zu guten bis hervorragenden Ergebnissen führt.

Die Methode wird wie folgt durchgeführt:

##### Vorbereitung des Materials

Entfernung des Holzes an der Oberfläche der Probe unter sterilen Bedingungen mit Messer oder Skalpell

Herstellung kleiner Holzpartikel je nach Dichte durch vorsichtiges Bohren oder Schneiden mit einem Skalpell oder Messer. Zur Vermeidung hoher Temperaturen wird langsam bebohrt und der Bohrer mit Eis periodisch gekühlt.

##### Zerkleinerung des Holzes

Die kleinen Holzpartikel werden in einer Retsch-Schwingmühle auf folgende Weise pulverisiert:

50-100mg Holzpartikel werden mit einer Stahlkugel (Durchmesser 5mm) in ein 2mL Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben

Die befüllten Röhrchen werden 5 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren

Pulverisierung in einer Retsch-Schwingmühle (Typ MM2) für 5 Minuten bei Stufe 75

Erneutes Frieren für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff und erneute Pulverisierung in der Retsch-Mühle für 5 Minuten. Je nach Dichte des Holzes ist die Dauer und Intensitätsstufe der Zerkleinerung zu variieren, um ein feines Pulver zu erhalten.

##### Lysis

Dieser Schritt erfolgte mit den Dneasy Plant Mini Kit von Qiagen mit folgenden Änderungen:

Zugabe von Polyvinylpyrrolidon (PVP40000, Roth) zum AP1 Lysis-Puffer (Qiagen) bis zu 3,3% (w/v). 500 bis 800mL dieses Lysis Puffers mit 5-8µL Rnase A werden in jedes

Röhrchen gegeben und gründlich gemischt (Vortex). Mehr als 500mL (bis 800mL) werden nur zugegeben, wenn viel Puffer vom Material absorbiert wird („Schwamm-Effekt“). Der Puffer wird über Nacht bei 65°C mit Schütteln oder Rotieren inkubiert. Dann wird 162-260mL Puffer AP2 (Qiagen) zugegeben, gemischt (Vortex), für 15 Minuten bei -20°C inkubiert und für 5 Minuten zentrifugiert (20.000 UpM).

### **DNA Reinigung**

Der Überstand nach Zentrifugation wird auf die „QIAshredder Mini Spin Column“ des Extraktionskits gegeben mit einem weiteren Röhrchen zum Sammeln der Flüssigkeit gegeben und 2 Minuten bei 20.000 UpM zentrifugiert. Die Weiteen Extraktionsschritte folgen dem Standardprotokoll für diesen Kit.

### **DNA Eluierung**

Die Eluierung erfolgt durch Zugabe von 50µL des Puffers AE (Qiagen) zu den „Spin Columns“. Dieser Schritt erfolgt zweimal; das zweite Eluat wird getrennt vom ersten gesammelt. Je nach Alter des Holzes, Position der Probenahme am Stamm und Größe des amplifizierten Fragmentes ist der Erfolg entweder bei Verwendung des ersten oder des zweiten Eluats größer (Rachmayanti et al., in press). Die DNA Konzentration kann anschließend spektrophotometrisch bestimmt werden.

Die wesentlichen Faktoren, die den Erfolg der Methode bestimmen, sind:

- Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes
- Bearbeitung des Holzes, insbesondere mittels Druck und Temperatur

Zudem wird der Erfolg der Amplifikation von DNA-Fragmenten nach Extraktion der DNA aus Holz von folgenden weiteren Faktoren beeinflusst:

- Position der Entnahme auf einer unbehandelten Stammscheibe (inneres Kernholz; äußeres Splintholz)
- Artspezifische Holzinhaltstoffe, die als Inhibitoren für die PCR wirken
- Art und genomischer Ursprung des untersuchten Fragmentes (Plastiden oder Zellkern)

Grundsätzlich ist es mit der entwickelten Methode möglich, auch große DNA-Fragmente (über 1000 bps) aus unbehandeltem Holz mit sehr großem Erfolg (100% oder nur wenig geringer) zu untersuchen. Ist das Holz dagegen stark druck- oder temperaturbehandelt, so sinken die Erfolgsraten, und es sind nur noch kürzere Fragmente (bis ca. 200bps) amplifizierbar. In einigen Fällen ist es bei stark behandeltem, für die Produktion von Fensterrahmen unter hohem Druck verleimten Holz sogar ganz unmöglich, DNA in ausreichender Quantität und Qualität zu extrahieren.

Vergleichende Untersuchungen zur Extraktion von DNA aus dem Holz anderer Bäume der Tropen und der gemäßigten Breiten zeigten, dass die Methode auch für diese Arten ohne oder mit nur geringen Modifikationen genutzt werden kann. Das Holz der Dipterocarpaceen enthält offenbar besonders viele die PCR hemmende Stoffe (Inhibitoren), so dass bei fast allen anderen untersuchten Arten die Erfolge der DNA Extraktion und der folgenden Amplifikation sogar noch größer waren als bei dieser Baumfamilie (Rachmayanti et al., in press). Die von Yoshida et al. (2007) dargestellte Methode zur Isolation von DNA aus Holz ist dem Isolationsprinzip nach ähnlich und zeigte ebenfalls bei vielen Baumarten hohen Erfolg.

### **3.1.2 Artunterscheidung**

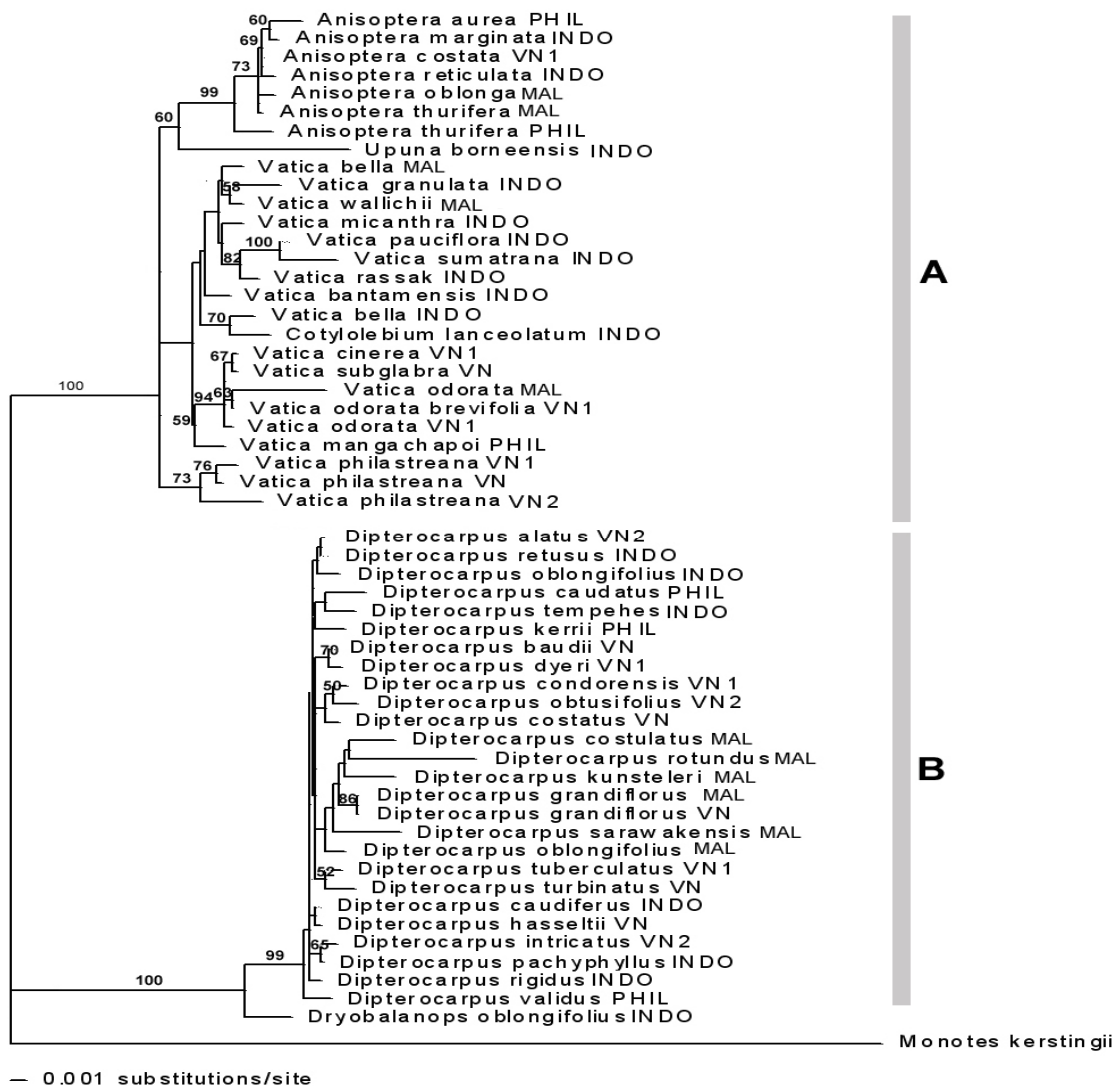
Untersuchungen zur zwischenartlichen Variation der Dipterocarpaceae in Indonesien mittels der PCR-RFLP und der cpSSR-Technik zeigten für vielen Arten einfache, diagnostische Merkmale, die nur diese Art aufweist. Für die große Mehrzahl der anderen Arten konnte eine streng artspezifische Kombination von Merkmalen mit Eigenschaften, die nur die betreffende Art aufweist, erkannt werden (Indrioko et al., 2006; Indrioko 2007). Die Analyse von Variation an anonymen, komplexen AFLP-Fingerabdrücken brachte Ergebnisse, die mit den auf der Basis von

Variation der cpDNA berechneten Stammbäumen (Phylogenien) sehr ähnlich waren (Cao et al., 2006a).

Die zuverlässige Erkennung von Arten sollte mit möglichst kurzen DNA-Fragmenten möglich sein, da nur diese mit großem Erfolg auch aus stark bearbeitetem Holz extrahiert werden können (siehe Abschnitt 3.1.1). Weitere Untersuchungen zur zwischenartlichen Variation konzentrierten sich daher auf solche kurzen, aber zwischen Arten sehr variablen Bereiche der cpDNA. Sowohl für den Tribus Shoreae (Gattungen *Shorea*, *Parashorea*, *Hopea*) als auch für den Tribus Dipterocarpaceae (Gattungen *Dipterocarpus*, *Vatica*, *Anisoptera*, *Cotylelobium*, *Upuna*, *Dryobalanops*) wurden entsprechende Bereiche der cpDNA identifiziert und durch vergleichende Sequenzierungen charakterisiert (Rachmayanti, in prep.; Nguyen, in prep., 2008). Diese Arbeiten erfolgten abgestimmt und mit gegenseitigem Austausch von Material mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tsumura, Japan (Tsumura et al., 2007).

Besonders informativ sind die cpDNA-Bereiche *trnL* Intron sowie *trnLF* intergenic spacer. In Abbildung 2 ist beispielhaft eine auf den Sequenzen dieser DNA-Bereiche basierende Phylogenie des Tribus Dipterocarpaceae dargestellt.

Abbildung 2: Molekulare Phylogenie des Tribus Dipterocarpaceae auf der Basis von cpDNA Variation (Nguyen et al., 2008)



In Ergänzung zu informativen Bereichen der cpDNA wird auch die ITS-Region (*internal transcribed spacer*) zur Identifikation diagnostischer DNA Sequenzen genutzt (Nguyen, in prep.).

### 3.1.3 Innerartliche Variationsmuster

Die Untersuchung innerartlicher Variation konzentrierte sich von Beginn an auf zunächst wenige, häufige und in Indonesien weit verbreitete Arten. Es wurde nach Variationsmustern gesucht, die starke räumliche Differenzierung erkennen lassen, um eine Zuordnung von fraglichen Proben zu Herkunftsregionen zu ermöglichen.

Leider erwies sich cpDNA von Dipterocarpaceen als innerhalb von Arten nur wenig variabel. Diese Beobachtung macht die Nutzung dieser Variation für Zwecke der Arterkennung besonders einfach und zuverlässig (siehe Abschnitt 3.1.2), steht aber einer Nutzung für die Zuordnung von fraglichen Proben zu verschiedenen Regionen innerhalb des Verbreitungsgebietes einer bestimmten Art entgegen (Indrioko, 2006).

Weitere Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Analyse von komplexen AFLP-Fingerabdrücken. Mit dieser Methode konnte eine gute Differenzierung nicht nur zwischen nahe verwandten Arten der Gattung *Shorea* (Cao et al., in press), sondern auch zwischen verschiedenen „Herkünften“ (Regionen) einer Art (Cao et al., 2006b) beobachtet werden. Mit Hilfe der AFLP-Technik ist daher grundsätzlich die Erkennung der Herkunft möglich.

Leider kann aus Holz DNA nicht in einer solchen Qualität isoliert werden, dass unmittelbar die AFLP-Technik zur Erkennung der Holzherkunft genutzt werden könnte. Es wurden daher einige AFLP-Banden ausgewählt, die besonders starke Differenzierung zwischen Regionen zeigen (Cao et al., 2006b). Diese AFLP-Banden wurden isoliert, mit ihren flankierenden Regionen sequenziert und in SCAR-Marker umgewandelt (Nuroniah in prep.; Nuroniah et al., 2008). So konnte beispielsweise ein Marker entwickelt werden, der es ermöglicht, *Shorea leprosula* aus Sumatra zuverlässig und eindeutig von Bäumen der gleichen Art auf Borneo zu unterscheiden.

Diese Ergebnisse belegen, dass eine Erkennung von Herkunftsregionen bei weit verbreiteten Arten grundsätzlich möglich ist, dass aber ein sehr hoher Untersuchungsaufwand erforderlich ist, um zu diesem Zweck geeignete Marker in ausreichender Menge und für viele Arten zu etablieren.

### 3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Projekt hatte zwei wesentliche Teilziele: Die Etablierung einer Extraktionsmethode, um DNA aus dem Holz von Dipterocarpaceen untersuchen zu können (Abschnitt 3.1.1), und die Entwicklung von Markern, die Aussagen über die Herkunft von fraglichem Holz zulassen (Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3). Beide Teilziele wurden erreicht. Allerdings ist es erwartungsgemäß nicht in allen Fällen möglich, DNA aus Holz zu extrahieren, und nicht immer können Marker genutzt werden, um das mögliche Herkunftsgebiet von Holz hinreichend genau einzuschränken.

Auf der Basis der umfangreichen Ergebnisse dieses Projektes ist es in vielen, aber nicht allen Fällen möglich, eine fehlerhafte Aussage über die angebliche Herkunft einer Probe aus Dipterocarpaceen-Holz zweifelsfrei als solche zu erkennen. Die Eignung molekulargenetischer Marker für Zwecke der Erkennung der Herkunft von Tropenholz ist damit dem Prinzip nach erwiesen. Es wurden allerdings auch die Grenzen der Methode deutlich: Einige grundlegende Probleme wie die Degenerierung der DNA im Zuge der Holzbearbeitung werden sich auch mit weiterem Erkenntnisfortschritt und verbesserten Techniken nicht vollständig lösen lassen. Ein besseres Verständnis räumlicher Variationsmuster insbesondere innerhalb von Arten in den Herkunftsregionen ist für genauere Aussagen zur Holzherkunft erforderlich. Dafür geeignete Sammlungen von Material und Laborarbeiten zur Etablierung der Marker sind sehr arbeitsintensiv.

Zusammenfassend liegt der wichtigste Nutzen des Projektes darin, dass es erstmals für eine wichtige Gruppe international gehandelter Tropenbäume möglich geworden ist, genetische Untersuchungen durchzuführen, die konkrete Aussagen über die mögliche Herkunft von Holz erlauben. Die Ergebnisse können damit insbesondere dazu genutzt werden, um fehlerhafte Aussagen zur Herkunft von Holz dieser Artengruppe nachzuweisen.

#### 4. Zusammenfassung

Eine bessere Überprüfbarkeit des Handels mit Tropenholz trägt zum Schutz tropischer Wälder bei, wenn es gelingt, illegal geerntetes Holz zu erkennen. Molekulare Untersuchungen zur Erkennung der Herkunft von Tropenholz sind daher von großem praktischen Interesse. Am Beispiel der wichtigen, sehr artenreichen asiatischen Baumfamilie Dipterocarpaceae wurde gezeigt, dass Untersuchungen genetischer Marker Aussagen über die Herkunft von Tropenholz erlauben.

Eine einfache Methode zur Extraktion von DNA aus Dipterocarpaceen-Holz wurde entwickelt und es wurde festgestellt, unter welchen Bedingungen die Extraktion erfolgreich ist. Sehr hohe Erfolgsquoten wurden bei nicht oder wenig bearbeitetem Holz erreicht. Aus stark bearbeitetem Holz lassen sich allerdings nur kürzere DNA-Fragmente mit hohem Erfolg nachweisen. Zudem wurden Marker entwickelt, die Aussagen über die botanische Art einer fraglichen Holzprobe zulassen. Da viele Arten auf ein kleines natürliches Verbreitungsgebiet beschränkt sind, ist damit die mögliche Herkunft des Holzes ebenfalls eingeschränkt. Am Beispiel der zwei wichtigsten und in Indonesien häufigsten Arten *Shorea leprosula* und *S. parvifolia* wurden Marker entwickelt, die durch Analyse innerartlicher Variationsmuster Aussagen über die Herkunft von Holz auch bei weit verbreiteten Arten erlauben.

Insgesamt wurde DNA aus über 3000 Proben mit regionalem Schwerpunkt in Indonesien analysiert. Das untersuchte Material ist eine gute Basis für die Entwicklung einer Datenbank, um Resultate aus fraglichen Holzproben mit Referenzdaten vergleichen zu können.

Häufig, aber nicht immer ist es auf der Basis der erzielten Resultate möglich, durch „genetische Fingerabdrücke“ Aussagen über den Ursprung von Dipterocarpaceen-Holz zu überprüfen. Empfohlen werden weiterführende, systematische Untersuchungen zu den Möglichkeiten der Extraktion von DNA aus stark bearbeitetem Holz, und Analysen innerartlicher Variationsmuster bei den am weitesten verbreiteten Dipterocarpaceen.

#### 5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen mit Hinweis auf weiterführende Fragestellungen

Die folgende Aufstellung bezieht sich in der ersten Spalte auf die im Projektantrag genannten Ziele (siehe Abschnitt 5 im Projektangebot), die im Arbeitsplan genannten Spezifikationen (siehe Abschnitt 8 im Projektangebot) und die in diesem Bericht und den dazugehörigen Anlagen dargestellten Ergebnisse.

	<b>Arbeitsziele (vgl. Abschnitt 5 im Projektangebot; siehe auch Abschnitt 1 in diesem Bericht)</b>	<b>Spezifikationen (vgl. Abschnitt 8 im Projektangebot)</b>	<b>Ergebnisse (vgl. Abschnitte 2 und 3 mit Anlagen in diesem Bericht)</b>
1	Gewinnung von für eine Untersuchung geeignetem Material (insbesondere Holzproben)	Holzproben: 400 Proben (Dipterocarpaceen) aus fünf Herkunftsländern und aus Lagern/Holzindustrie; keine Blattproben	332 Holzproben gewonnen und untersucht; kein Material aus Burma (vgl. Abschnitt 1.1.1); zusätzlich über 3000 Blattproben
2	Etablierung von Methoden zur Extraktion von DNA aus dem Holz von Dipterocarpaceen in für weitere Untersuchungen hinreichender Quantität und Qualität	Vergleiche Extraktionskits, CTAB, SDS Methode	Vergleiche wie geplant durchgeführt; Methode etabliert und publiziert (Rachmayanti et al., 2006); Methode umfangreich getestet (Rachmayanti et al., in press)

3	Etablierung geeigneter DNA-Marker, die eine Differenzierung von Arten und Herkunftsregionen erlauben	PCR-RFLPs, Sequenzierungen, cpSSRs, AFLPs, SCARs	Alle vorgesehenen Markersysteme etabliert und eingesetzt; weit umfangreicheres Material als geplant an den Markern analysiert
4	Etablierung eines Entscheidungssystems zur Erkennung der örtlichen Holzherkunft bei Dipterocarpaceen durch Unterscheidung von Arten und / oder Provenienzen	Publikationen in wissenschaftlichen Journals, Implementierung eines Verfahrens	Diverse Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften (siehe 6.1); Diskussion einer möglichen Implementierung auf Tagungen, z.B. Königswinter, Oktober 2007
5	Test der grundsätzlichen Übertragbarkeit der Resultate auch auf andere tropische Baumarten oder Artengruppen	100 Proben von 10 Arten (andere Baumarten)	74 Proben von 10 anderen Baumarten; Tests erfolgreich durchgeführt

Die im Vergleich zu den Planungen etwas geringeren Anzahlen untersuchter Holzproben (332 statt 400 Dipterocarpaceen; 74 statt 100 andere Baumarten) hatten keinen Einfluss auf die Erreichung der grundlegenden Projektziele und wurden durch die Sammlung und Untersuchung von insgesamt über 3000 anderen Proben von Dipterocarpaceen mehr als kompensiert.

Im Projektangebot wurde zu den Erfolgsaussichten (dortiger Abschnitt 10) festgestellt: „Ein unmittelbar praxistaugliches, sofort einsetzbares Verfahren zur Erkennung der Holzherkunft wird dennoch kaum zum Projektende erreicht werden können,...“ (Projektangebot, S. 10). Im Ergebnis wurden jedoch im Rahmen des Projektes Fortschritte erreicht, die die entwickelten Verfahren bereits zum jetzigen Zeitpunkt für das Oberziel „Erkennung der Holzherkunft bei Dipterocarpaceen“ einsetzbar machen, auch wenn sicher nicht in allen Fällen eindeutige Ergebnisse erzielt werden können. Die tatsächlich erreichten Ziele gehen damit deutlich über die geplanten und im Projektangebot genannten Ziele hinaus.

Aus dem Projektablauf und den Ergebnissen können zudem folgende **Empfehlungen** für weiterführende Untersuchungen gegeben werden:

- Die Trennung der Optimierung von Methoden zur Extraktion von DNA aus Holz von der Etablierung von räumlich differenzierenden Markern hat sich bewährt und sollte auch für andere Arten in ähnlicher Weise durchgeführt werden.
- Die frühe **Einbeziehung lokaler Partner** aus den Herkunftsländern von Tropenholz ist für einen Projekterfolg sehr bedeutsam. Dies bezieht sich insbesondere auf die Sammlung von Material, aber auch auf die Implementierungsphase für ein Kontrollsystem.
- Die Schaffung von Möglichkeiten des **legalen Im- und Exports von Material für Forschungszwecke** ist eine wichtige Voraussetzung, um die begonnen Arbeiten bei Dipterocarpaceen und anderen Baumarten der Tropen fortführen zu können, und insbesondere um zu diesem Zweck geeignete Datenbanken aufbauen zu können.
- Weiterführende Untersuchungen zu den Möglichkeiten der **Extraktion von DNA aus bearbeitetem Holz** und der Bedeutung verschiedener Bearbeitungen für den Erfolg der Extraktion bei verschiedenen Baumarten der Tropen werden empfohlen.

- Eine weitere **Verfeinerung der räumlichen Auflösung differenzierender Marker** für ausgewählte, besonders wichtige Arten der Dipterocarpaceae ist sehr arbeitsaufwändig, aber grundsätzlich möglich und für den Aufbau von Datenbanken unumgänglich.

## 6. Zusammenfassung ausgewählter Übersichtsartikel

- 6.1 **Indrioko, S., Cao, C.-P., Luu, H.T., Siregar, I., Siregar, U., Leinemann, L., Gailing, O. & Finkeldey, R. (2005). Studien zur genetischen Variation südostasiatischer Dipterocarpaceen als Grundlage für ihre Erhaltung. In: Korn, H. & Feit, U. (eds) Treffpunkt Biologische Vielfalt V. Bundesamt für Naturschutz, Bonn. S. 235-239.**

The tree family Dipterocarpaceae has a pantropical distribution but reaches its maximum of species diversity in tropical moist forests of Southeast-Asia. For example, more than 260 species, many of them endemic, are described for Borneo. Many of these forests are dominated by dipterocarps; frequently more than half of all trees, and in particular tall canopy trees, belong to the family. The wood of dipterocarps is highly valued (trade name: for example Meranti), and the wood processing industry of several Southeast-Asian countries critically depends on a supply with dipterocarp timber. By-products such as resin are harvested by the local population from dipterocarps. Southeast-Asian dipterocarp forests are hotspots of global biodiversity, but they are critical endangered due to unsustainable forest management and ongoing forest destruction.

The genetic variation of most dipterocarps is completely unexplored in spite of their importance for biodiversity, national economies, international timber markets, and local benefits. Conservation of dipterocarps must take the genetic resources of the family into account. At least a basic understanding of patterns of genetic variation within and among species is necessary to design efficient conservation strategies.

Several ongoing research projects to assess genetic variation of Southeast-Asian dipterocarps at the Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Göttingen, Germany, are described. Molecular phylogenies based on variation of DNA from chloroplasts and AFLPs in general support the taxonomic division of Indonesian dipterocarps into nine genera. Patterns of genetic variation of the endemic *Dipterocarpus condorensis* reveal surprisingly high levels of genetic variation in the small and scattered relic populations in Vietnam. An island population is genetically differentiated from mainland populations. All populations are predominantly outcrossing, although significant levels of selfing were observed in all populations.

The potential to use molecular markers in order to identify the origin of dipterocarp wood and wood products is mentioned. These techniques might get considerable importance since it will be possible to check the origin of wood from sustainable managed, certified forests.

- 6.2 **Finkeldey, R., Gailing, O., Hattemer, H.H. & Vornam, B. (2007). Molekulare Analyse von Pflanzenteilen in der Forensik. In: Hermann, B & Hummel, S (eds) Biologische Spurenkunde. Kriminalbiologie. Springer-Verlag, Heidelberg. S. 343-362.**

Viele Aktivitäten des Menschen, die zu einer Zerstörung naturnaher Lebensräume und zur Beeinträchtigung von Tier- und Pflanzenarten führen, sind illegal. Die in diesem Zusammenhang von Pfeiffer in diesem Band dargestellten molekularbiologischen Ansätze zur Identifikation von Tierarten lassen sich selbstverständlich grundsätzlich auch auf Pflanzen übertragen. Die Bestimmung der Zugehörigkeit von Pflanzenmaterial zu bestimmten geschützten Arten mittels molekularer Methoden ist insbesondere für den nationalen und internationalen Handel mit entsprechenden Produkten von erheblicher Bedeutung.

Der Handel mit illegal gewonnenen Pflanzen und ihren Produkten beschränkt sich jedoch nicht nur auf geschützte Arten. So stammt beispielsweise noch immer ein beachtlicher Teil des international gehandelten Holzes aus nicht-nachhaltiger Waldbewirtschaftung. Insbesondere in den Tropen stellt der Einschlag und der Handel mit Holz aus „Raubbau“ den Regelfall dar. Dies verstößt dabei gegen internationale Abkommen wie die Biodiversitäts-Konvention und gegen nationales Recht. Unter diesem Aspekt kommt molekulare Methoden, die die Erkennung des Ursprungs von Tropenholz zum Ziel haben, auch forensische Bedeutung zu. Entsprechende Verfahren können helfen, den illegalen Einschlag und den Handel mit illegal geerntetem Holz erkennbar zu machen und damit Gesetzesverstöße insbesondere in Erzeugerländern von Tropenholz aufzudecken.

Molekulargenetische Methoden, die die Erkennung des Ursprungs von Tropenholz zum Ziel haben, werden gegenwärtig für die wichtige Baumfamilie der Dipterocarpaceen entwickelt (Finkeldey et al. in press). Die Dipterocarpaceen bestimmen mit über 400 Arten zahlreiche tropische Wälder Südostasiens und stellen eine wichtige Gruppe international gehandelter Tropenhölzer (Handelsname: z.B. Meranti) dar. Illegaler Holzeinschlag ist ein gravierendes Problem in fast allen Ländern Südost-Asiens und insbesondere in Indonesien. Die Handelswege des illegal geernteten Holzes und der daraus gewonnenen Produkte sind kaum nachvollziehbar; das Holz gelangt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem erheblichen Anteil in den internationalen Handel.

Aussagen und Dokumente über den Ursprung von Dipterocarpaceen-Holz und Holzprodukten sollen mit molekulargenetischen Methoden überprüfbar gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst Methoden zur Extraktion von DNA aus Holz entwickelt. Erfahrungen mit der Extraktion von DNA aus dem Holz von Baumarten der gemäßigten Zone liegen vor (Deguilloux et al. 2002; Deguilloux et al. 2003). Auch aus dem Holz von Dipterocarpaceen kann DNA extrahiert und anschließend amplifiziert werden (Rachmayanti et al., 2006; in press). Der Erfolg der Amplifikation der mehr oder weniger stark degradierten DNA ist dabei negativ mit der Länge der Fragmente korreliert.

Parallel werden molekulare Methoden zur Artunterscheidung auf der Basis von Variation der cpDNA etabliert (Indrioko et al. 2006). Da viele Arten der Dipterocarpaceen endemisch sind, also in nur kleinen Verbreitungsgebieten auftreten, ermöglicht bereits die Erkennung der botanischen Art mittels molekularer Methoden Aussagen über den möglichen Ursprungsort von Holz. Methoden zur Unterscheidung räumlich weit getrennter Vorkommen z.B. auf verschiedenen Inseln Indonesiens werden für weit verbreitete Arten wie *Shorea leprosula* und *S. parvifolia* etabliert (Cao et al. in press).

Die Anwendung molekulargenetischer Verfahren für Zwecke der Überprüfung der Holzherkunft erfordert die Beobachtung von Variation zwischen Arten und verschiedenen Regionen innerhalb des Verbreitungsgebiets einer Art. Es werden daher künftig insbesondere Polymorphismen der cpDNA (vgl. Abschnitt 3) und stark differenzierende AFLP-Banden durch Sequenzierung und andere Methoden charakterisiert.

Die Erfahrungen hinsichtlich der Möglichkeiten der Extraktion von DNA aus Dipterocarpaceen-Holz und der Etablierung geeigneter Marker sollen später genutzt werden, um auch bei anderen Arten tropischer Nutzhölzer ähnliche Analysemethoden zu etablieren, die gegen den illegalen Holzeinschlag und den Handel mit illegal geschlagenem Holz sowie daraus hergestellten Produkten eingesetzt werden können“.

**6.3 Finkeldey, R., Rachmayanti, Y. & Gailing, O. (2007). Molecular genetic tools for the identification of the origin of wood. In: Kües, U (ed) Wood production, wood technology and biotechnological impacts. Universitätsverlag Göttingen, Göttingen. S. 143-158.**



Molekulargenetische Marker werden in der Zukunft eine wichtige Rolle für die Identifizierung der Holzherkunft spielen, da genetische Merkmale stabil sind, da Umweltbedingungen keinen Einfluss auf ihre Variationsmuster haben.

Allerdings wird ein positiver Nachweis der genauen Holzherkunft in naher Zukunft in vielen Fällen nicht möglich sein, da für die meisten Arten detaillierte Informationen über die räumliche Verteilung „informativer“ genetischer Marker im gesamten Verbreitungsgebiet fehlen. Durch die Kombination verschiedener Marker wird es möglich sein größere geografische Regionen zu unterscheiden. Damit werden molekulare Marker sicherlich in der Zukunft ein sehr zuverlässiges und wirksames Werkzeug sein, um Aussagen hinsichtlich der geografischen Herkunft von Holzproben zu überprüfen. Falschdeklarationen der Holzherkunft können als solche erkannt werden. Die molekulare Holzzertifizierung ermöglicht eine effizientere Kontrolle des globalen Handels mit Holz und Holzprodukten. Sie erleichtert und fördert den Handel und die Vermarktung von Holz aus zertifizierten, nachhaltig bewirtschafteten Wäldern. Somit kann der Einsatz genetischer Marker zur Holzzertifizierung zur nachhaltigen Bewirtschaftung von Wäldern und zur langfristigen Erhaltung der Biodiversität beitragen.

**6.4 Finkeldey, R., Rachmayanti, Y., Nuroniah, H., Nguyen, P.N. Cao, C. & Gailing, O. (2008) Identification of the timber origin of tropical species by molecular genetic markers – the case of dipterocarps. VTI Agriculture and Forestry Research – Special Issue “Tagung Königswinter. Fingerprinting methods for the identification of timber origins. Okt. 2007.**

Dipterocarpaceen sind die wichtigsten Nutzholz-Arten aus dem tropischen Asien. Daneben enthält die Baumfamilie der Dipterocarpaceen auch viele gefährdete Arten. Daher kommt der Entwicklung von Markern zur Identifizierung der geografischen Herkunft von Dipterocarpaceen-Holz höchste Priorität zu. Das gilt sowohl im Kontext des internationalen Holzhandels als auch für die Erhaltung der Biodiversität.

Mit dem Ziel der Identifizierung der örtlichen Holzherkunft haben wir Material von über 3000 Dipterocarpaceen-Bäumen von insgesamt 116 Arten gesammelt. Dieses Material bietet eine geeignete Basis eine Referenzdatenbank mit genetischen Daten zur Identifizierung der Arten und geografischen Regionen zu erstellen.

Es wurden einfache und verlässliche Methoden für die DNA-Isolierung aus Dipterocarpaceen-Holz entwickelt. Diese Methoden zeigten sich ebenfalls als geeignet für andere Baumarten aus den Tropen und aus gemäßigten Breiten. Unbehandeltes Holz war sogar noch einige Monate bis Jahre nach der Fällung für die Isolierung von DNA geeignet. Die Erfolgsraten für behandelte Holzproben waren geringer. Allerdings war es auch hier oft möglich kurze DNA-Fragmente von einigen hundert Basenpaaren Länge mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) zu vervielfältigen. Zusätzliche systematische Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluss der Holzbehandlung auf den Erfolg der DNA-Isolierung besser zu verstehen.

Die Identifizierung der biologischen Art ist eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung der Holzherkunft. Dies gilt vor allem für die gefährdeten Arten der sehr artenreichen Dipterocarpaceen. Hier sind Rückschlüsse auf die mögliche geografische Herkunft des Materials aufgrund der hohen Anzahl endemischer Arten mit begrenzter geografischer Verbreitung möglich. In den meisten Fällen ist eine zuverlässige Artunterscheidung an Chloroplasten-DNA möglich.

Die innerartliche Variation an anderen DNA-Markern (*AFLPs = Amplified Fragment Length Polymorphisms*) ist sehr hoch. Die Variation ist allerdings hauptsächlich innerhalb der Populationen verteilt. Allerdings ist es möglich, wenn auch technisch sehr anspruchsvoll, DNA-Marker zu entwickeln, die eine starke Differenzierung zwischen geografischen Regionen einer Art aufweisen. Beispielsweise konnten wir einen solchen DNA-Marker (*SCAR-Marker = Sequence Characterized*

*Amplified Region Marker*) aus einem stark differenzierenden AFLP-Fragment entwickeln. Dieser Marker erlaubt die Unterscheidung von *Shorea leprosula* Bäumen, die auf Sumatra wachsen von denen, die auf Borneo vorkommen.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass die Dipterocarpaceen eine geeignete Artengruppe sind, um den Nutzen molekularer Marker zur Überprüfung der Herkunft von Tropenholz nachzuweisen, und dass es die zur Zeit verfügbaren Methoden und der gegenwärtige Kenntnisstand erlauben die Deklaration der geografischen Herkunft von Dipterocaracen-Holz mit Hilfe von molekularen Markern zu überprüfen und Fehldeklarationen in vielen aber nicht in allen Fällen nachzuweisen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um informative DNA-Marker zu entwickeln, die zwischen geografischen Herkünften einer Art unterscheiden.

## 7. Literatur

### 7.1 Aus dem Projekt entstandene Veröffentlichungen und relevante Veröffentlichungen mit Beteiligung der Arbeitsgruppe<sup>1</sup>

#### 7.1.1 Originalarbeiten in wissenschaftlichen Zeitschriften

##### 7.1.1.1 Erschienene Originalarbeiten

Cao, C.-P., Gailing, O., Siregar, I., Indrioko, S. & Finkeldey, R. (2006) Genetic variation at AFLPs for the Dipterocarpaceae and its relation to molecular phylogenies and taxonomic subdivisions. *Journal of Plant Research* 119: 553-558.\*

Cao, C.-P., Finkeldey, R., Siregar, I., Siregar, U. & Gailing, O. (2006) Genetic diversity within and among populations of *Shorea leprosula* Miq. and *S. parvifolia* Dyer (Dipterocarpaceae) in Indonesia detected by AFLPs. *Tree Genetics and Genomes* 2: 225-239.\*

Indrioko, S., Gailing, O. & Finkeldey, R. (2006) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Indonesia based on chloroplast DNA. *Plant Systematics and Evolution* 261: 99-115.\*

Rachmayanti, Y., Leinemann, L., Gailing, O. & Finkeldey, R. (2006) Extraction, Amplification and Characterization of Wood DNA from Dipterocarpaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 45-55.\*

##### 7.1.1.2 Im Druck befindliche Originalarbeiten

Cao, C.-P., Gailing, O., Siregar, I.Z., Siregar, U.J. & Finkeldey, R. (in press) Genetic variation in nine *Shorea* species (Dipterocarpaceae) in Indonesia revealed by AFLPs. Im Druck in *Tree Genetics and Genomes*.\*

Rachmayanti, Y., Leinemann, L., Gailing, O. & Finkeldey, R. (in press) DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success. Im Druck in *Forensic Sciences International: Genetics*.\*

#### 7.1.2 Arbeiten in Sammelbänden

##### 7.1.2.1 Publiizierte Beiträge

Indrioko, S., Cao, C.-P., Luu, H.T., Siregar, I., Siregar, U., Leinemann, L., Gailing, O. & Finkeldey, R. (2005). Studien zur genetischen Variation südostasiatischer Dipterocarpaceen als Grundlage für ihre Erhaltung. In: Korn, H. & Feit, U. (eds) *Treffpunkt Biologische Vielfalt V*. Bundesamt für Naturschutz, Bonn. S. 235-239.

---

<sup>1</sup> Die mit einem \* gekennzeichneten Publikationen und Manuskripte sind diesem Bericht beigelegt und als Teil des Berichtes zu werten. Andere Publikationen werden auf Anfrage gerne übersendet.

- Finkeldey, R., Rachmayanti, Y. & Gailing, O. (2007). Molecular genetic tools for the identification of the origin of wood. In: KÜES, U (ed) Wood production, wood technology and biotechnological impacts. Universitätsverlag Göttingen, Göttingen. S. 143-158.\*
- Finkeldey, R., Gailing, O., Hattemer, H.H. & Vornam, B. (2007). Molekulare Analyse von Pflanzenteilen in der Forensik. In: Hermann, B & Hummel, S (eds) Biologische Spurenkunde. Kriminalbiologie. Springer-Verlag, Heidelberg. S. 343-362.
- Tsumura, Y., Kado, T., Taguchi, Y., Fukue, Y., Tani, N., Yoshimura, K., Kamiya, K., Harada, K., Takeuchi, Y., Diway, B., Finkeldey, R., Lee, S.L., Norwati, M. (2007). Molecular database for species classification of *Shorea* species (Dipterocarpaceae). In: Fujii, T. (ed) Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify *Shorea* species wood and its origin, September 2007, Tokyo, Japan. <http://ss.ffpri.affrc.go.jp/symposium/symp070925/Proceedings.pdf>
- Finkeldey, R., Rachmayanti, Y., Nuroniah, H., Nguyen, P.N., Cao, C. & Gailing, O. Identification of the timber origin of tropical species by molecular genetic markers – the case of dipterocarps. In Degen, B. (ed): Proceedings of the international symposium on the identification of tropical timber, October 2007, Königswinter, Germany.\*

### 7.1.3 Dissertationen und M.Sc. Arbeiten

#### 7.1.3.1 Abgeschlossene Dissertationen und M.Sc. Arbeiten

- Cao, C.-P. (2006) Genetic variation of the genus *Shorea* in Indonesia. Georg-August-Universität Göttingen, Elektronische Dissertationen. Göttingen, SUB Göttingen. <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2006/cao/cao.pdf>
- Indrioko, S. (2006) Chloroplast DNA variation in Indonesian Dipterocarpaceae – phylogenetic, taxonomic, and population genetic aspects. Georg-August-Universität Göttingen, Cuvillier Verlag, Göttingen. 127S.
- Villarin, R.A. (2006) Phylogenetic analysis of Philippine dipterocarps based on PCR-RFLP of the chloroplast DNA (cpDNA) marker. M.Sc. Thesis, Visayas State University, Leyte, Philippines.

#### 7.1.3.2 Laufende Dissertationsvorhaben

- Rachmayanti, Y.: Molecular genetic markers as tools to infer the origin of dipterocarp wood and wood products
- Nguyen, N.P.: A molecular phylogeny of tribe Dipterocarpeae (Dipterocarpaceae) based on DNA sequence variation (eingereicht)
- Nuroniah, H.: Development of informative molecular markers for the identification of the timber origin of dipterocarps

### 7.1.4 Vorträge und Abstracts aus Tagungsbänden, Poster, etc.:

- Indrioko, S., Gailing, O. & R. Finkeldey. 2004. Molecular Phylogeny of the Dipterocarpoideae (Dipterocarpaceae) in Indonesia using Chloroplast DNA. Botanikertagung 2004, Braunschweig.
- Cao, C.-P., Gailing, O., Siregar, I., Indrioko, S. & R. Finkeldey. 2004. Comparison of phylogenies based on AFLP and PCR-RFLP marker techniques for the Dipterocarpaceae. Botanikertagung 2004, Braunschweig. S. 446.
- Rachmayanti, Y., Finkeldey, R., Leinemann, L. & O. Gailing. 2005. The application of molecular markers for the identification of wood from different origins in the tropical tree family Dipterocarpaceae. XVII International Botanical Congress. Wien. S. 302.
- Indrioko, S., Finkeldey, R. & O. Gailing. 2005. Chloroplast DNA variation in Indonesian Dipterocarpaceae. XVII International Botanical Congress. Wien. S. 462.
- Cao, C., Finkeldey, R. & O. Gailing. 2005. Geographic differentiation within *Shorea leprosula* and *Shorea parvifolia* (Dipterocarpaceae) as revealed by amplified fragment length

- polymorphism (AFLP) markers. XVII International Botanical Congress. Wien. S. 462-463.
- Cao, C.-P., Finkeldey, R., Siregar, I., Siregar, U. & O. Gailing. 2006. Genetic relationships among nine *Shorea* species in Indonesia using population samples. PopBio 2006, Halle (Saale). S. 49.
- Gailing, O., Cao, C., Nuroniah, H., Rachmayanti, Y. & R. Finkeldey. 2006. Analysis of genetic variation in Indonesian *Shorea* (Dipterocarpaceae) species: AFLP and SCAR markers. Population Genetics and Genomics of Forest Trees: from Gene Function to Evolutionary Dynamics and Conservation. IUFRO. October 1st - 6th, 2006. Alcalá de Henares, Madrid. Spain.
- Gailing, O., Cao, C., Nuroniah, H., Rachmayanti, Y. & R. Finkeldey. 2006. Structure of genetic variation in Indonesian *Shorea* (Dipterocarpaceae) species: AFLP and SCAR markers. 17th international symposium Biodiversity and Evolutionary Biology Bonn 24. –28. Sept 2006.
- Gailing, O., Cao, C., Nuroniah, H., Rachmayanti, Y. & R. Finkeldey. 2007. The Development Of Molecular Genetic Tools For The Identification Of The Origin Of Wood In Dipterocarpaceae. Plant & Animal Genomes XV Conference, January 13-17, 2007. San Diego.
- Rachmayanti, Y., Gailing, O. & R. Finkeldey. 2007. Molecular tools an facilitate sustainable use of forests. A case study on Dipterocarpaceae. Utilisation of diversity in land use systems: sustainable and organic approaches to meet human needs. Deutscher Tropentag, October 9-11, 2007 in Witzenhausen.
- Nguyen, N. P., Gailing, O. & R. Finkeldey. 2008. Molecular phylogeny of tribe Dipterocarpeae (Dipterocarpaceae, subfamily Dipterocarpoideae) based on sequence data of chloroplast and nuclear ribosomal DNA. Systematics 2008, Göttingen 7.-11. April.\*
- Nuroniah, H.S., Gailing, O. & R. Finkeldey. 2008. Diagnostic markers to identify the geographic origin of *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). Systematics 2008, Göttingen 7.-11. April.\*
- Gailing, O., Rachmayanti, Y., Nuroniah, H., Nguyen, N.P., Cao, C., Villarin, R. & R. Finkeldey. 2008. The use of phylogenetic and phylogeographic data for wood certification in Dipterocarpaceae. Systematics 2008, Göttingen 7.-11. April.

## 7.2 Zitierte Literatur

- Cao, C.-P. (2006) Genetic variation of the genus *Shorea* in Indonesia. Georg-August-Universität Göttingen, Elektronische Dissertationen. Göttingen, SUB Göttingen, <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2006/cao/cao.pdf>
- Cao, C.-P., Gailing, O., Siregar, I., Indrioko, S. & Finkeldey, R. (2006a) Genetic variation at AFLPs for the Dipterocarpaceae and its relation to molecular phylogenies and taxonomic subdivisions. Journal of Plant Research 119: 553-558.
- Cao, C.-P., Finkeldey, R., Siregar, I., Siregar, U. & Gailing, O. (2006b) Genetic diversity within and among populations of *Shorea leprosula* Miq. and *S. parvifolia* Dyer (Dipterocarpaceae) in Indonesia detected by AFLPs. Tree Genetics and Genomes 2: 225-239.
- Cao, C.-P., Gailing, O., Siregar, I.Z., Siregar, U.J. & Finkeldey, R. (in press) Genetic variation in nine *Shorea* species (Dipterocarpaceae) in Indonesia revealed by AFLPs. Im Druck in *Tree Genetics and Genomes*.
- Cavers, S., Navarro, C. & Lowe, A.J. (2003). Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. Mol. Ecol. 12: 1451-1460.
- Dumolin-Lapègue, S., M.-H. Pemonge, L. Gielly, P. Taberlet & R. J. Petit (1999). Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. Mol. Ecol. 8: 2137-2140.
- Deguilloux, M.-F., M.-H. Pemonge & R. J. Petit (2002). Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. The Royal Society 269: 1039-1046.

- Deguilloux, M.-F., M.-H. Pemonge, L. Bertel, A. Kremer & R. J. Petit (2003). Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Mol. Ecol.* 12: 1629-1636.
- Godoy, J. A., and P. Jordano (2001). Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Mol. Ecol.* 10: 2275-2283.
- Hamilton, M. B. (1999). Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature* 401: 129.
- Hamrick, J. L. & Godt, M.J.W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. Royal Soc. London, Ser. B.* 351: 1291-1298.
- Indrioko, S. (2006) Chloroplast DNA variation in Indonesian Dipterocarpaceae – phylogenetic, taxonomic, and population genetic aspects. Georg-August-Universität Göttingen, Cuvillier Verlag, Göttingen. 127S.
- Indrioko, S., Gailing, O. & Finkeldey, R. (2006) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Indonesia based on chloroplast DNA. *Plant Systematics and Evolution* 261: 99-115.
- Nguyen, N. P., Gailing, O. & R. Finkeldey. 2008. Molecular phylogeny of tribe Dipterocarpeae (Dipterocarpaceae, subfamily Dipterocarpoideae) based on sequence data of chloroplast and nuclear ribosomal DNA. *Systematics 2008, Göttingen* 7.-11. April.
- Nuroniah, H.S., Gailing, O. & R. Finkeldey. 2008. Diagnostic markers to identify the geographic origin of *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). *Systematics 2008, Göttingen* 7.-11. April.
- Petit, R., U. Csaikl, S. Bordács, K. Burg, E. Coart, J. Cottrell, B. van Dam, D. Deans, S. Dumolin-Lapègue, S. Fineschi, R. Finkeldey, A. Gillies, I. Glaz, P. G. Goicoechea, J. S. Jensen, A. O. König, A. J. Lowe, S. F. Madsen, G. Mátyás, R. C. Munro, M. Olalde, M.-H. Pemonge, F. Popescu, D. Slade, H. Tabbener, D. Turchini, S. G. M. de Vries, B. Ziegenhagen and A. Kremer (2002b). Chloroplast DNA variation in European white oaks. *Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. For. Ecol. Manage.* 156: 5-26.
- Rachmayanti, Y., Leinemann, L., Gailing, O. & Finkeldey, R. (2006) Extraction, Amplification and Characterization of Wood DNA from Dipterocarpaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 45-55.
- Rachmayanti, Y., Leinemann, L., Gailing, O. & Finkeldey, R. (in press) DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success. *Im Druck in Forensic Sciences International: Genetics.*
- Tsumura, Y., Kado, T., Taguchi, Y., Fukue, Y., Tani, N., Yoshimura, K., Kamiya, K., Harada, K., Takeuchi, Y., Diway, B., Finkeldey, R., Lee, S.L., Norwati, M. (2007). Molecular database for species classification of *Shorea* species (Dipterocarpaceae). In: Fujii, T. (ed) *Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify Shorea species wood and its origin*, September 2007, Tokyo, Japan. <http://ss.ffpri.affrc.go.jp/symposium/symp070925/Proceedings.pdf>. pp. 35-38.
- Villarin, R.A. (2006) Phylogenetic analysis of Philippine dipterocarps based on PCR-RFLP of the chloroplast DNA (cpDNA) marker. M.Sc. Thesis, Visayas State University, Leyte, Philippines.
- Yoshida, K., Kagawa, A. & Nishiguchi, M. Extraction and detection of DNA from wood for species identification. In: Fujii, T. (ed) *Proceedings of the international symposium on development of improved methods to identify Shorea species wood and its origin*, September 2007, Tokyo, Japan. <http://ss.ffpri.affrc.go.jp/symposium/symp070925/Proceedings.pdf>. pp. 27-34

## 8. Darstellung des Projektes in der Öffentlichkeit

Das Projekt wurde insbesondere unmittelbar nach seinem Beginn in verschiedenen öffentlichen Medien stark beachtet. Die folgende Aufstellung ist nicht vollständig, spiegelt aber die unterschiedlichen Medien wider, in denen über das Projekt und seine Ziele mehr oder weniger ausführlich berichtet wurde.

### *Pressemitteilungen:*

1. BMVEL; Nr. 277 vom 14.10.2004
2. Uni Göttingen; Nr. 310 vom 25.10.2004

### *Tageszeitungen:*

3. Süddeutsche; Kurzbericht
4. Hamburger Abendblatt vom 27.10.2004; Kurzbericht
5. Göttinger Tageblatt: Geschäftsideen-Wettbewerb
6. Göttinger Tageblatt: Genetischer Fingerabdruck von Tropenholz

### *Forst- und Landwirtschaftliche Fachmedien:*

7. AFZ/Der Wald vom 15.10.2004
8. Umweltjournal vom 18.10.2004
9. DLZ-Agrarmagazin vom 15.10.2004

### *Internet*

10. Innovation Niedersachsen ([www.innovation.niedersachsen.de](http://www.innovation.niedersachsen.de)) vom 8.10.2004
11. Genpost ([www.gene.ch](http://www.gene.ch))
12. AGRA-Europe ([www.agra-europe.de](http://www.agra-europe.de))
13. Nachrichten Gentechnologie ([netpure.de](http://netpure.de)) vom 18.10.2004
14. Waldportal ([www.waldportal.de](http://www.waldportal.de)) vom 4.10.2004

### *Radio:*

15. LORA München; Telefoninterview
16. Deutschlandfunk vom 1.11.2004; Interview; Laboreindrücke; Internet (<http://www.dradio.de/dlf/sendungen/umwelt/318277/>)

### *TV:*

17. Bayrisches Fernsehen; Redaktion „Unser Land“; Fr., 11.3.2005, 19.15

### *Sonstige Medien:*

18. Uni | in | form (03/2004)
19. ADF „Wadenbeißer“

## Anhang

### I Darstellung, Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse in Bezug auf den bei Einholung des Projektangebotes angegebenen Forschungsbedarf/ Entscheidungshilfebedarf

Zuverlässige Methoden zur Überprüfung der Holzherkunft bei Baumarten der Tropen sollten im Rahmen dieses Projektes entwickelt werden. Da das Erbmolekül DNA sowohl sehr stabil und damit zumindest prinzipiell auch aus „totem“ Holzgewebe extrahierbar und untersuchbar ist und da genetische Variation eine Information über den geografischen Ursprung einer Probe enthalten kann, sollten „genetische Fingerabdrücke“ (*genetic fingerprints*) genutzt werden, um eine solche Methode zu entwickeln.

Aufgrund art- bzw. artengruppen-spezifischer Besonderheiten war es notwendig, sich auf eine bestimmte Artengruppe zu beschränken und für diese Artengruppe entsprechende molekulare Nachweis- beziehungsweise Überprüfungsverfahren zu entwickeln. Die wichtige Baumfamilie der insbesondere im tropischen Südostasien verbreiteten Dipterocarpaceen wurde ausgewählt, um Methoden der Extraktion von DNA zu etablieren und räumliche Verteilungsmuster genetischer Variation zu untersuchen.

Es wurde eine Methode zur Extraktion von DNA aus Holz der Dipterocarpaceen entwickelt, die den folgenden Anforderungen genügt:

- Einfach und in molekulargenetischen Laboren ohne besondere Hochreinheitsbereiche einsetzbar
- Kostengünstig und teilweise automatisierbar für spätere Routineanwendungen
- DNA Extraktion aus Holz in einer Quantität und Qualität, die die Amplifikation von DNA Fragmenten mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) erlaubt
- Hohe Erfolgsquote bei der Extraktion von DNA aus frischen, älteren und bearbeiteten Holz

Die nach umfangreichen, vergleichenden Untersuchungen entwickelte Methode basiert auf einem häufig zur Extraktion von DNA aus frischen pflanzlichen Gewebe, beispielsweise Blättern, genutzten *kit* der Firma QIAGEN, der für die besonderen Anforderungen der DNA-Extraktion aus Holz optimiert wurde. Diese Methode wurde in der internationalen Fachzeitschrift *Plant Molecular Biology Reporter* publiziert (Rachmayanti et al., 2006). Umfangreiche Tests der Methode und verschiedener Modifikationen ergaben, dass insbesondere die folgenden Faktoren den Erfolg bestimmen:

- Bearbeitung (Pressen, Verleimen, etc.) von Holz
- Position der Entnahme von Proben aus äußerem Splint- oder innerem Kernholz-Bereich
- Artspezifische, als Inhibitoren der PCR wirkende Inhaltsstoffe im Holz
- Länge und genomischer Ursprung (Zellkern oder Plastiden) des mittels PCR zu amplifizierenden DNA Fragmentes

Diese Methode wurde auch bei Hölzern anderer tropischer Arten sowie bei Baumarten der gemäßigten Breiten zur DNA-Extraktion mit in der Regel sehr gutem Erfolg genutzt. Es konnten DNA-Fragmente mit einer Länge von unter 500 bps aus nicht oder nur wenig bearbeitetem Holz in nahezu allen Fällen erfolgreich extrahiert werden. Auch längere Fragmente ließen sich mit hohem Erfolg aus nicht behandeltem Holz extrahieren. Geringer Erfolg wurden dann beobachtet, wenn die Extraktion aus behandeltem Holz erfolgte und anschließend lange DNA-Fragmente amplifiziert werden sollten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das im Forschungsantrag angegebene Ziel der Etablierung einer einfachen Methode zur Extraktion von DNA aus unbehandeltem und wenig behandeltem Tropenholz in vollem Umfang erreicht wurde. Die Methode eignet sich prinzipiell auch für die Extraktion aus stärker behandeltem Holz, die Erfolgsquoten sind dann aber geringer.

Aus Holz amplifizierte DNA-Fragmente können nur dann für die Erkennung der Herkunft von Holz eingesetzt werden, wenn sie Informationen über den möglichen Ursprungsort enthalten. Das zweite Hauptziel der Untersuchung war daher die Entwicklung von DNA-Markern, die anhand der Beobachtung möglichst kurzer DNA-Fragmente die Erkennung der Herkunftsregion von Material erlauben. Die Dipterocarpaceen sind eine sehr artenreiche Familie mit über 400 beschriebenen Arten in Südostasien und vielen endemischen und geschützten Arten. Die vielen botanischen Arten werden zu wenigen Holzartengruppen (z.B. Meranti für *Shorea*-Arten) zusammengefasst. Gegenwärtig werden Dipterocarpaceen fast ausschließlich in nicht gepflanzten Naturwäldern genutzt, es gibt nur wenige Plantagen. Die Erkennung der botanischen Art ist ein wichtiger und bei seltenen, endemischen Arten sogar ein hinreichender Schritt, um Aussagen über die Herkunft von Holz treffen zu können, und zudem unter dem Aspekt des Schutzes bedrohter Arten höchst bedeutsam.

Verschiedene Methoden wurden genutzt, um anhand weniger, informativer DNA-Bereiche aus der DNA von Chloroplasten (cpDNA) die botanische Art erkennen zu können. Auch aus Holz ist cpDNA einfach extrahierbar. Die im Rahmen von zwei Promotionen (Indrioko, 2006; Indrioko et al., 2006; Nguyen, in prep.) zusammengetragenen Ergebnisse zu molekularen Phylogenien der Dipterocarpaceae können daher genutzt werden, um durch Untersuchung von cpDNA Markern die botanische Art einer fraglichen Holzprobe in fast allen Fällen bestimmen zu können.

Die Etablierung von Markern, die für weit verbreitete und häufige Arten eine Erkennung innerartlicher Variationsmuster zulassen, die Aussagen über die Herkunft von Material erlauben, erwies sich als schwierig. Allerdings wurde hohe Variation und teilweise starke Differenzierung innerhalb der in Indonesien häufigen Arten *Shorea parvifolia* und *S. leprosula* bei anonymen AFLP-Markern beobachtet (Cao et al., 2006). Durch Konvertierung in SCAR (*sequence characterized amplified regions*)-Marker konnten beispielhaft für *S. leprosula* Merkmale entwickelt werden, die für diese wichtige Dipterocarpacee eine Unterscheidung in die Hauptverbreitungsgebiete Sumatra und Borneo erlaubt.

Zusammenfassend ergeben sich die folgenden Hauptergebnisse aus dem Projekt:

1. In sehr vielen Fällen ist die Extraktion von DNA aus dem Holz von Dipterocarpaceen in hinreichender Qualität möglich, um weitere Untersuchungen durchführen und Variation erkennen zu können.
2. Die Bestimmung der botanischen Art ist mittels der etablierten DNA-Marker in fast allen Fällen möglich. Häufig ist eine solche Bestimmung hinreichend, um das mögliche Ursprungsgebiet des Holzes stark einzugrenzen, da viele Dipterocarpaceen endemisch sind, also nur ein kleines Verbreitungsgebiet aufweisen.
3. Die Erkennung von Herkunftsregionen ist für weit verbreitete Arten bedeutsam. Beispielhaft wurde für die wichtige Art *Shorea leprosula* ein Marker entwickelt, der eine sichere Differenzierung in Haupt-Verbreitungsregionen erlaubt.

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes erlauben es, Aussagen über die Herkunft von einer Holzprobe einer Baumfamilie der Tropen mittels molekularer Marker zu überprüfen. **In vielen, aber nicht allen Fällen ist es möglich, eine fehlerhafte Aussage über die angebliche Herkunft von Dipterocarpaceen-Holz zweifelsfrei als solche zu erkennen.**

Weiterer Forschungsbedarf wird insbesondere hinsichtlich der Optimierung von DNA-Extraktionsmethoden aus bearbeitetem Holz sowie hinsichtlich der weiteren Etablierung und Verfeinerung von räumlich informativen Markern bei den häufigsten und am weitesten verbreiteten Dipterocarpaceen gesehen.



## II Kurzfassung

Eine bessere Überprüfbarkeit des Handels mit Tropenholz trägt zum Schutz tropischer Wälder bei, wenn es gelingt, illegal geerntetes Holz zu erkennen. Molekulare Untersuchungen zur Erkennung der Herkunft von Tropenholz sind daher von großem praktischen Interesse. Am Beispiel der wichtigen, sehr artenreichen asiatischen Baumfamilie Dipterocarpaceae wurde gezeigt, dass Untersuchungen genetischer Marker Aussagen über die Herkunft von Tropenholz erlauben.

Eine einfache Methode zur Extraktion von DNA aus Dipterocarpaceen-Holz wurde entwickelt und es wurde festgestellt, unter welchen Bedingungen die Extraktion erfolgreich ist. Sehr hohe Erfolgsquoten wurden bei nicht oder wenig bearbeitetem Holz erreicht. Aus stark bearbeitetem Holz lassen sich allerdings nur kürzere DNA-Fragmente mit hohem Erfolg nachweisen. Zudem wurden Marker entwickelt, die Aussagen über die botanische Art einer fraglichen Holzprobe zulassen. Da viele Arten auf ein kleines natürliches Verbreitungsgebiet beschränkt sind, ist damit die mögliche Herkunft des Holzes ebenfalls eingeschränkt. Am Beispiel der zwei wichtigen und in Indonesien häufigsten Arten *Shorea leprosula* und *S. parvifolia* wurden Marker entwickelt, die durch Analyse innerartlicher Variationsmuster Aussagen über die Herkunft von Holz auch bei weit verbreiteten Arten erlauben.

Insgesamt wurde DNA aus über 3000 Proben mit regionalem Schwerpunkt in Indonesien analysiert. Das untersuchte Material ist eine gute Basis für die Entwicklung einer Datenbank, um Resultate aus fraglichen Holzproben mit Referenzdaten vergleichen zu können.

Häufig, aber nicht immer ist es auf der Basis der erzielten Resultate möglich, durch „genetische Fingerabdrücke“ Aussagen über den Ursprung von Dipterocarpaceen-Holz zu überprüfen. Empfohlen werden weiterführende, systematische Untersuchungen zu den Möglichkeiten der Extraktion aus stark bearbeitetem Holz, und Analysen innerartlicher Variationsmuster bei den am weitesten verbreiteten Dipterocarpaceen.

### III Ergänzende Schlussfolgerungen und Empfehlungen für die Praxis

1. Der praktische Ablauf der Untersuchung einer fraglichen Probe in einem molekulargenetischen Labor erfolgt in etwa in folgender Weise:

**Empfang der Probe, Vorbereitung:** Die Holzprobe wird per Post oder auf andere Weise angeliefert. Sie ist in der Regel nicht besonders behandelt, möglicherweise verunreinigt und unterschiedlich alt, groß und behandelt. Sie wird untersucht, das für eine DNA-Extraktion aussichtsreichste Stück wird identifiziert, die Oberfläche wird entfernt und Holzpartikel werden durch Bohren oder Scheiden gewonnen (siehe 3.1.1 im Haupttext dieses Schlußberichtes; Tag 1).

**Extraktion der DNA** (siehe 3.1.1): Lysis über Nacht erforderlich, daher Vorbereitung am Tag 1, DNA Extraktion am Tag 2.

**Amplifikation mittels PCR:** Je nach Fragestellung, Art oder Artengruppe, Zustand des Materials (Alter, Bearbeitung) und Stand des Wissens werden DNA Abschnitte ausgewählt, die mittels der PCR (siehe Anhang V für Abkürzungen und Definitionen) vervielfältigt werden. Dauer:  $\frac{1}{2}$  -1 Tag (Tag 3).

**Untersuchung amplifizierter DNA Fragmente:** Je nach Methode und Fragestellung erfolgt die Analyse amplifizierter DNA Fragmente auf unterschiedliche Weise, zum Beispiel durch elektrophoretische Trennung und Größenbestimmung von Fragmenten bei Mikrosatelliten (siehe Definitionen) oder durch Sequenzierung. Dauer je nach Methode:  $\frac{1}{2}$  bis 1 Tag (selten 2 Tage) (Tag 4).

**Analyse und Bericht der Ergebnisse:** Die im Labor erhobenen Rohdaten müssen analysiert und interpretiert werden, bevor ein Bericht an die einsendende Behörde oder andere Interessenten gegeben werden kann (Tag 5).

Es ist also mit einer Untersuchungsdauer von etwa 5 Arbeitstagen zu rechnen, bevor Ergebnisse berichtet werden können. Sind einzelne Arbeitsschritte zu wiederholen, so erhöht sich die Dauer entsprechend. Spätestens nach 2 Wochen ist klar, ob Ergebnisse erhalten werden können, falls erste Versuche der DNA Extraktion oder der PCR scheitern sollten.

Die gegenwärtigen **Kosten** für eine Routine-Untersuchung hängen stark von der Zahl der regelmäßig zu untersuchenden Proben ab. Hauptanteil sind Personalkosten für wissenschaftliches und technisches Personal. Werden gleichzeitig beispielsweise 20 Proben analysiert, so ist dafür mit einem Zeitaufwand von insgesamt mindestens 20 Stunden für wiss. und techn. Personal zu rechnen. Dieser Aufwand ist kaum geringer, wenn eine einzelne Probe analysiert wird. Der Zeitaufwand pro Probe schwankt also stark. Auch mittelfristig ist durch weitere Fortschritte bei molekulargenetischen Methoden nicht damit zu rechnen, dass ein Arbeitsaufwand von weniger als einer Stunde je Probe realisiert werden kann, da für hier relevante Fragestellungen eine Automatisierung nur begrenzt möglich ist. Damit ist gegenwärtig mit Personalkosten von im günstigen Fall etwa 30 Euro pro Probe auszugehen. Die Kosten können aber auch deutlich höher sein und fallen auch dann, wenn keine oder nur nicht eindeutige Ergebnisse erzielt werden können. Kosten für Verbrauchsmaterial sind besser schätzbar und im Vergleich zu Personalkosten geringer. Sie dürften nur in Ausnahmefällen bei der Notwendigkeit zur Untersuchung vieler Marker oder bei Sequenzierungen über 10 Euro pro Probe liegen, wenn die Untersuchung in einem gut ausgelasteten und modern eingerichteten Labor erfolgt. Diese groben Kostenschätzungen beziehen sich auf die Untersuchung von Proben im Routinebetrieb und ausdrücklich nicht auf wesentlich aufwendigere Arbeiten zur Etablierung von neuen molekulargenetischen Analysemethoden.

2. Die etablierten Methoden zur Extraktion und Analyse von DNA aus Holz ermöglichen grundsätzlich die Artidentifizierung tropischer Baumarten. Mit der Artidentifizierung ist es möglich, Tropenholz von Arten mit einem sehr kleinen Verbreitungsgebiet (endemische Arten) einem Ursprungsgebiet zuzuordnen bzw. Fehldeklarationen aufzudecken. Endemische Arten sind aufgrund ihres eingeschränkten Verbreitungsgebietes besonders gefährdet, da die Zerstörung der betreffenden Flächen gleichzusetzen ist mit dem Totalverlust der Art. Mit der Überprüfbarkeit der Holzherkunft wird damit ein wesentlicher Beitrag zur Erhaltung der biologischen Diversität tropischer Wälder geleistet.
3. Im Rahmen des Projektes konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass es auch für weitverbreitete Tropenbaumarten, wie die im Projekt untersuchten *Shorea leprosula* und *S. parvifolia*, möglich ist, einzelne Herkunftsgebiete zu identifizieren.
4. Über das Projektziel hinaus ermöglichen es die im Rahmen des Projektes entwickelten Methoden und Verfahren, Tropenholz aus Plantagen zu zertifizieren. Da für die Erzeugung von Plantagenholz sehr häufig auf Material mit eingeschränkter genetischer Variabilität zurückgegriffen wird, handelt es sich hier im Wesentlichen um eine Sortenidentifizierung auf der Grundlage genetischer Fingerabdrücke der in einer Plantage verwendeten Genotypen. Holz mit abweichendem genetischem Fingerabdruck kann dann als nicht aus der betreffenden Plantage stammendes Holz erkannt werden. Zum Schutz tropischer Urwälder ist dieses Verfahren besonders für Arten interessant, deren Holz gemeinhin als Plantagenholz, also nicht aus Raubbau stammend, vermarktet wird.
5. Die Isolierung von DNA aus unbehandeltem Tropenholz und die Untersuchung von informativen DNA-Markern war erfolgreich (Erfolgsquote 100% für DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 600 Nukleotiden). Bei behandeltem Holz (unter hohem Druck und hoher Temperatur verleimtes Holz) lag die Erfolgsquote bei immerhin 75% für kurze DNA-Fragmente (150 Nukleotide) und bei ca. 50% für mittellange Fragmente (600 Nukleotide).
6. Hinweise zur Probennahme: Äußeres Splintholz ist besser geeignet als Ausgangsmaterial der DNA-Isolierung als inneres Kernholz (stärkere Degradierung der DNA).

### **Notwendige weitere Untersuchungen:**

Es konnte in diesem Projekt beispielhaft gezeigt werden, dass die DNA-Isolierung auch aus schwierigem Ausgangsmaterial (verarbeitete Holzproben) möglich ist. Informative DNA-Marker wurden bei einer wichtigen Dipterocarpaceen-Art entwickelt und können für die Überprüfung der örtlichen Holzherkunft eingesetzt werden. Daraus lassen sich folgenden Schlussfolgerungen für weitere notwendige Untersuchungen ziehen.

1. Es müssen weitere informative DNA-Marker für die Artunterscheidung entwickelt werden. Eine Datenbank mit artspezifischen DNA-Sequenzen sollte für die Familie der Dipterocarpaceen erstellt werden.
2. Genetische Marker, die zwischen Regionen einer Art unterscheiden, konnten für die wichtige Baumart *Shorea leprosula* entwickelt werden. Die Entwicklung solcher Marker hat aber die Kenntnis über die geografische Verteilung der genetischen Information einer Art über das gesamte Verbreitungsgebiet zur Grundlage. Solche Informationen fehlen für die meisten tropischen Baumarten. Die Entwicklung entsprechender Verfahren und die Durchführung solcher genetischen Inventuren ist zeitaufwendig und kostenintensiv. Hier sollten Prioritäten entsprechend der aktuellen bzw. zukünftigen wirtschaftlichen Bedeutung der Arten gesetzt werden.

## IV Abstract

### *Title*

The use of molecular genetic markers to identify the origin of timber of tropical tree species

### *Author*

Reiner Finkeldey

### *Introduction*

Illegal logging is a main cause for the destruction of tropical forest ecosystems. The development of non-manipulable tools to control the origin of timber and timber products from tropical tree species will greatly contribute to distinguish legally from illegally harvested wood. This will promote the marketing of tropical timber from sustainable managed forests and will eventually support the ban of illegally harvested material.

We tested the application of molecular genetic markers to identify the origin of tropical Dipterocarpaceae. Dipterocarps are a very species-rich family dominating tropical forests in South- and Southeast-Asia. They are the main source of tropical timber (trade name, for example, meranti) from this region. Since many species are endangered, species identification is important for conservation. The distribution of many species is restricted to particular islands or ecosystems. Thus, the identification of botanical species is often sufficient to prove a false declaration of the origin of timber.

### *Methods*

More than 3000 dipterocarps representing over 110 different species have been sampled. Sampling has been most intensive on the Indonesian islands of Borneo and Sumatra. Locations from Vietnam, Thailand, and the Philippines are represented as well. We developed a simple method to extract DNA from dipterocarp wood based on a frequently used extraction kit. We tested the success of the method to extract DNA of good quality for PCR amplification from freshly cut timber and processed wood products.

In a parallel attempt, we developed markers to distinguish between closely related species from the same timber group and between regions from widely distributed, common species. Different marker types including PCR-RFLPs of chloroplast DNA (cpDNA), cpSSRs, and sequences of nuclear and cpDNA were compared.

### *Results*

The success rate for amplification was influenced by the age of wood, the degree of processing, and inhibitory substances. It was possible to obtain full success by a careful selection of the amplified DNA fragment (fragment length; genomic origin, repeat number), appropriate dilution of template DNA, repeated elution, and choice of the most suitable position for investigation (inner or outer wood). The method proved to be applicable for the majority of investigated dipterocarp wood samples and for most other investigated material as well. Success rates were lower for treated wood and wood products, but short DNA fragments were successfully amplified from processed wood.

Species distinction is often possible by the investigation of cpDNA fragments of different length. The identification of the region of origin is hampered by a moderate degree of genetic differentiation for the two common dipterocarps *Shorea leprosula* and *S. parvifolia*. However, we observed strong geographic differentiation at several AFLP markers. These bands were converted to SCAR markers which, for example, allow to unambiguously distinguish between *S. leprosula* trees from Sumatra and Borneo.

### *Conclusions*

Dipterocarps are a suitable species group to implement a system for the identification of the origin of tropical timber. DNA isolation is often feasible from unprocessed and treated wood and wood products, and numerous informative markers with regard to proving false declarations of the timber origin were developed.

## V Erläuterung wichtiger Abkürzung und Definitionen

### **AFLP**

Amplifizierte Fragmentlängen-Polymorphismen (amplified fragment length polymorphism): Eine typische ‚Fingerprint‘ Methode (siehe Genetischer Fingerabdruck). In einer Untersuchung werden zahlreiche DNS Fragmente produziert, die komplexe, in der Regel für jedes Individuum spezifische Muster bilden. Ein solches Muster kann aus über 100 Banden bestehen, die in einigen Pflanzen auftreten, in anderen dagegen nicht, die also Variation (Polymorphie) zeigen.

### **Bp (Basenpaar)**

Die Länge eines Bruchstücks der DNA (siehe auch Definition DNA) wird in der Regel in Basenpaaren (base pair; bp) angegeben. Die DNA ist eine Doppel-Helix; jeder Baustein (Nukleotid) ist daher mit einem komplementären Nukleotid gepaart. Die vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) bilden die wichtigsten Einheiten, durch die sich Nukleotide unterscheiden. Ein DNS-Abschnitt (oder Fragment), welcher beispielsweise aus zwei zueinander komplementären, jeweils 500 Nukleotide langen Einzelsträngen besteht, ist 500 bps (base pairs) lang.

### **Chloroplasten DNA (cpDNA)**

Die DNA (=DNS; siehe dort) der Chloroplasten ist ringförmig, ist in mehreren Kopien in jedem Chloroplasten vorhanden und besteht aus über 100.000bps. Sie findet sich nicht nur in grünen Chloroplasten, sondern auch in anderen Plastiden und kann daher auch aus Zellen isoliert werden, die keine Chloroplasten enthalten. Es ist daher möglich, cpDNA auch aus Holz zu isolieren. Sie variiert vergleichsweise wenig innerhalb von Arten, kann aber gut zur Artunterscheidung und gelegentlich auch zur Unterscheidung von Herkunftsregionen genutzt werden. CpDNA wird bei Laubbäumen und den meisten anderen Pflanzen in mütterlicher Linie, also nur über den Samenelter, vererbt. Bei Nadelbäumen liegt dagegen eine Vererbung über den Pollenelter vor. Häufig untersuchte Regionen der cpDNA, die auch in dieser Untersuchung analysiert wurden, sind die Regionen *trnL*-Intron, *trnL-trnF* intergenic spacer, und *petD*

### **CTAB Methode**

**Cetyltrimethylammoniumbromid** (CTAB) wird bei der Isolation von DNA häufig genutzt. Bei der CTAB Methode werden Polysaccharide und Proteine durch Komplexbildung mit CTAB abgetrennt.

### **DNA (=DNS)**

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS; englisch: DNA) ist ein in allen Lebewesen vorkommendes Biomolekül und die Trägerin der Erbinformation. Sie enthält unter anderem die Gene, welche für die biologische Entwicklung eines Organismus und den Stoffwechsel in der Zelle notwendig sind. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird die Desoxyribonukleinsäure überwiegend mit der englischen Abkürzung DNA (deoxyribonucleic acid) bezeichnet; die parallel bestehende deutsche Abkürzung DNS wird seltener verwendet.

Im Normalzustand ist die DNA in Form einer Doppelhelix organisiert. Chemisch gesehen handelt es sich um eine Nukleinsäure, ein langes Kettenmolekül (Polymer) aus Einzelstücken, sogenannten Nukleotiden. Jedes Nukleotid besteht aus einem Phosphat-Rest, einem Zucker und einer von vier organischen Basen mit den Kürzeln A, T, G und C (siehe auch Definition Basenpaare; bps).

Bei den Zellen von Pflanzen ist der Großteil der DNA im Zellkern als Chromosomen organisiert und findet sich im Zellkern (Kern-DNA oder nuclear DNA; daher nDNA). Manche Zellorganellen, nämlich Mitochondrien und Chloroplasten, enthalten ebenfalls DNA (mtDNA und cpDNA; siehe Definition dort).

### **Genetischer Fingerabdruck**

Der Ausdruck genetischer Fingerabdruck (englisch: genetic fingerprint) ist ein insbesondere für forensische Anwendungen häufig verwendeter Sammelbegriff. Methoden, die auf der Basis einer DNA-Analyse die Erkennung von Individuen oder die Zuordnung von Material zu einem einzelnen Individuum oder, seltener, zu einer Gruppe von Individuen wie einer „Herkunft“ zulassen, werden als genetischer Fingerabdruck bezeichnet. Dies können zum Beispiel komplexe AFLPs, SCARs, Mikrosatelliten, Varianten der cpDNA, (siehe Definitionen zu diesen Begriffen) oder andere molekulare Marker sein. Beim Menschen werden am häufigsten Mikrosatelliten als genetischer Fingerabdruck genutzt.

### **Mikrosatelliten (=SSRs)**

Mikrosatelliten sind aufgrund ihrer in der Regel sehr hohen Variation die wichtigsten molekularen Marker für forensische Fragestellungen. Es handelt sich um kurze, in der Regel 1-3 bps (siehe Basenpaare) lange Sequenzen, die vielfach wiederholt sind. Individuen unterscheiden sich in der Zahl dieser „tandemartigen“ Wiederholungen. Mikrosatelliten variieren oft sehr stark; sie werden als „hypervariabel“ beschrieben. Sie werden auch als einfache Sequenzlängenwiederholungen (englisch: simple sequence repeats; daher SSRs oder short tandem repeat; STR) bezeichnet. Mikrosatelliten treten sowohl in der nDNA (DNA des Zellkerns) als auch in der cpDNA (dann cpSSRs) auf (siehe Definitionen). In der Regel werden Mikrosatelliten mittels der PCR (siehe Definition PCR) analysiert. Da die so amplifizierten DNA-Fragmente relativ kurz (wenige hundert bps) sind, ist es möglich, Mikrosatelliten auch bei stark degradiertem, „altem“ DNA zu analysieren.

### **PCR; Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase-chain-reaction; daher PCR) erlaubt es, kurze DNA Abschnitte von unter 100 bis etwa 3000 bps massenhaft zu vermehren (zu „amplifizieren“) und damit untersuchbar zu machen. Fast alle molekulargenetischen Marker, zum Beispiel AFLPs, SSRs, PCR-RFLPs (siehe Definitionen dort) basieren heute auf der PCR.

### **Phylogenie**

Die evolutionäre Verwandtschaft unterschiedlicher taxonomischer Einheiten (z.B. Arten) wird in Phylogenien deutlich. Heute basieren entsprechende Untersuchungen meist auf „molekularen Phylogenien“, also der Ähnlichkeit von bestimmten Bereichen der DNA. Phylogenetische Untersuchungen können auch genutzt werden, um Merkmale (Marker) zu entwickeln, die die Differenzierung von Arten oder Regionen zulassen.

### **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)**

Unterschiedliche Längen von DNA-Fragmenten können zur Unterscheidung von Individuen, Arten, Herkünften oder anderen taxonomischen Einheiten genutzt werden. Diese Unterschiede können häufig erst nach dem „Zerschneiden“ (der Restriktion) von DNA mit bestimmten Enzymen sichtbar gemacht werden. Eine einfache Möglichkeit zur Analyse von Polymorphismen ist die Vermehrung bestimmter DNA-Bereiche mittels der PCR (siehe Definition dort) und anschließender Zerschneidung mit Restriktionsenzymen (PCR-RFLPs).

### **SCAR Marker**

Auf der PCR (siehe Definition dort) basierende, einfache Marker, die es erlauben, einen sehr spezifischen Abschnitt der DNA auf Variation hin zu untersuchen, werden auf Englisch als sequence characterized amplified regions (daher SCAR) bezeichnet. Die Amplifikation des Bereiches setzt voraus, dass die Sequenz der Randbereiche bekannt ist, um mittels PCR das Fragment vermehren (amplifizieren) zu können. Die Entwicklung von SCAR Markern ist oft zeit- und kostenaufwendig. SCAR-Marker können sich eignen, um spezifischen Fragestellungen wie der Unterscheidung von Herkunftsregionen bei einer Pflanzenart nachzugehen zu können.

**Sequenzierung**

Die Analyse der Abfolge der Nukleotide bzw. der vier Basen (A,C,G,T) in einem Abschnitt der DNA eines Individuums (siehe definition DNA für weitere Informationen).

**SSR**

Siehe Mikrosatelliten