

SCHLUSSBERICHT

¹Universität Hamburg, Zentrum Holzwirtschaft,
Arbeitsbereich Weltforstwirtschaft
Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg

in Zusammenarbeit mit

²Thünen-Institut für Forstgenetik
Sieker Landstrasse 2, 22927 Großhansdorf

³Double Helix Tracking Technologies (DHTT)
96A Club Street, Singapore 069464

⁴Plant Genetic Diagnostics GmbH (PGD)
Alte Landstraße 26, 22927 Großhansdorf

zum Thema

„Identifizierung von Holzherkünften“

(2808HS023)

von

**Céline Blanc-Jolivet^{1,2}, Bernd Degen², Aki Höltken⁴, Lasse Schindler²,
Darren Thomas³ und Michael Köhl¹**

Projekt- und Berichtszeitraum

September 2009 – Mai 2013

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert.

Gliederung

1	Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens	3
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens	3
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	7
2	Material und Methoden	11
2.1	Stichprobennahme von Merbau im Verbreitungsgebiet	11
2.2	Entwicklung neuer Genmarker und genetische Inventuren	12
2.2.1	Kernmikrosatelliten (nSSRs)	12
2.2.2	Chloroplasten Marker	12
2.2.3	„Single-Nucleotid-Polymorphism“ (SNPs)	12
2.3	Daten Auswertung	12
2.4	Optimierung der DNA-Extraktion	13
3	Ergebnisse	13
3.1	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	13
3.1.1	Stichprobennahme Referenzproben	13
3.1.2	Genetische Inventuren	15
3.1.3	Eignung der Genmarker für die Kontrolle der Holzherkunft	23
3.1.4	Optimierung DNA Extraktion	26
3.1.5	Praxis Test	27
3.1.6	Datenbank	33
3.1.7	Internationale Netzworkebildung	33
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	34
4	Zusammenfassung	36
5	Summary	38
6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen	40
7	Literaturverzeichnis	42

1 Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Planung

A) *Durchführung von Pilotstudien zur genetischen Herkunftsidentifizierung bei den drei Merbau-Arten *Intsia palembanica*, *I. bijuga*, und *I. moeleri*.*

Wir wollten für Merbau den Ansatz der Multilocus-Genotyp-Zuordnung testen. Bei diesem Ansatz sollten zunächst über das zu untersuchende Verbreitungsgebiet der Baumart Stichproben in einzelnen Populationen genommen und für die beprobten Individuen der Multilocus-Genotyp an mehreren Genmarkern bestimmt werden. Diese Daten sollten in der späteren Auswertung als „Referenzdatensatz“ dienen. Anschließend sollten in einem Praxistest dieselben Genmarker benutzt werden, um die Multilocus-Genotypen von Proben unbekannter oder fraglicher Herkunft zu bestimmen.

Entwicklung neuer Genmarker

Für die Pilotstudie sollten als zwei verschiedene Typen von Genmarkern die Kernmikrosatelliten (nSSRs) und „Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) eingesetzt werden.

Stichprobennahme / Genetische Inventuren

Wir planten eine zweistufige Stichprobennahme. Zunächst sollten für die Baumarten *Intsia palembanica* und *Intsia bijuga* Stichproben von jeweils 10 über das gesamte Verbreitungsgebiet der Arten verteilten Populationen gewonnen werden. In jeder Population sollten Gewebeprobe (Blätter oder Kambium) von jeweils mindestens 50 Individuen gesammelt werden. An diesen 1000 Proben sollten von der Universität Hamburg die genetischen Inventuren mit Kernmikrosatelliten und von DHTT die genetischen Inventuren mit SNPs durchgeführt werden.

Für die aus der Literatur beschriebene dritte Merbau-Art, *Intsia moeleri*, hatten wir ein anderes Vorgehen geplant: Die Art spielt beim internationalen Holzhandel keine Rolle. Zudem gibt es unter den Taxonomen keine Einigkeit darüber, ob dies überhaupt eine eigenständige Art ist. Sie soll ausschließlich in Neukaledonien vorkommen. Für diese Baumart planten wir zunächst zwei möglichst weit voneinander entfernte Populationen der *Intsia*-Bäume auf Neukaledonien zu beproben und auf genetische Unterschiede zu *Intsia bijuga* bei Kernmikrosatelliten hin zu untersuchen. Anhand dieser genetischen Daten wollten wir dann überprüfen, ob es sich um eine eigene Art handelt.

Praxistest

Die Firma „Hamberger Flooring GmbH & Co. KG“, der Marktführer für Parkett in Deutschland, hatte zugesagt, bei einem Praxistest mitzumachen. Im Rahmen des Projekts sollten Holzproben von Merbau aus unterschiedlichen Phasen der Verarbeitung der Firma zum Blindtest zur genetischen Untersuchung bei der Firma Plant Genetic Diagnostics GmbH geschickt werden. Parallel sollte ein ähnlicher Praxistest durch DHTT mit dem australischen Holzhändler „Simmonds Lumber Group“ durchgeführt werden.

Optimierung DNA-Extraktion

Ausgehend von bestehenden DNA-Extraktionsprotokollen sollten systematisch frische und unterschiedlich alte sowie unterschiedlich behandelte Holzproben mit schrittweise modifizierten Extraktionsroutinen behandelt werden (Cullings 1992; Doyle & Doyle 1987;

Rachmayanti et al. 2006). Auf diese Weise sollte das optimale DNA-Extraktionsprotokoll für Merbau gesucht werden.

B) Bereitstellung der genetischen Daten und Informationen zur geographischen Zuordnung (Koordinaten) für eine internationale Datenbank zur Holzherkunftsidentifizierung am Thünen-Institut

Es sollte hierzu am Thünen-Institut für Forstgenetik eine Datenbank aufgebaut werden, in welche die Merbau-Daten eingespeist werden sollten.

C) Beitrag zum Aufbau eines internationalen Netzwerks oder einer Plattform zur Holzherkunftsidentifizierung

Wir planen im Rahmen des Projekts zwei internationale Workshops zu dem Thema. Ein Workshop sollte in Hamburg und ein Workshop soll in Singapur durchgeführt werden. Ferner sollte ein Austausch mit anderen Fachkollegen zu dem Thema in der Region Süd-Ost-Asien erfolgen. Auch Prof. Dr. Andrew Lowe, der Leiter des australischen Zentrums für Evolutionsbiologie und Biodiversität der Universität Adelaide, hatte seine Kooperation zugesagt.

Das Projekt war ursprünglich für einen Zeitraum von 24 Monaten geplant (Abb. 1).

		2009	2010	2011
Nr.	Laufende Nummer Monat	00000000 12345678	0111111111112 901234567890	2222 1234
1	Stichprobennahme 1. Phase => jeweils 10 Populationen I. bijuga, I. palembanica	XXXX		
2	Stichprobennahme I. moeleri in Neukaledonien	XXX		
3	Entwicklung von SNP-Markern	XXXX		
4	Genetische Inventuren mit nSSRs an Individuen der 1. Phase	XXXXXXXX		
5	Genetische Inventuren mit SNPs an Individuen der 1. Phase	XXXX	XX	
6	Datenauswertung Ergebnisse 1. Phase Stichprobennahme		XXX M1	
7	Workshop Hamburg		X	
8	Stichprobennahme 2. Phase => jeweils 20 Populationen I. bijuga, I. palembanica		XXXXX	
9	Genetische Inventuren mit nSSRs an Individuen der 2. Phase		XXXXXXXXXX	
10	Genetische Inventuren mit SNPs an Individuen der 2. Phase		XXXXXXXXXX	
11	Datenauswertung Ergebnisse 2. Phase Stichprobennahme			XX M2
12	Eingabe in Datenbank des vTI			X
13	Praxistest mit Holz- Parkettfirmen			XX
14	Workshop Singapur			X
15	Erstellung Abschlussbericht			XX

Abbildung 1: Diagramm zum ursprünglich geplanten Zeitverlauf der einzelnen Arbeitsschritte des Projekts

Ablauf

Der Zuwendungsbescheid zum Vorhaben ging Ende September 2009 bei der Universität Hamburg ein. Als wissenschaftliche Angestellte im Projekt konnte Frau Dr. Céline Blanc-Jolivet zum 01.01.2010 eingestellt werden. Eine frühere Einstellung war aus administrativen Gründen nicht möglich. Mit der Firma Double Helix Tracking Technology (DHTT), dem wichtigsten Projektpartner, hat die Universität Hamburg im November 2010 einen Vertrag zur Einbindung in das Projekt abgeschlossen. Auch hier brauchte die Verwaltung einen Vorlauf von mehreren Wochen. Als tatsächlicher Beginn des Projekts ist demnach vielmehr Anfang

Januar 2010 anzusehen. Mit der Stichprobennahme und den Laborarbeiten konnte im Jahr 2009 nicht begonnen werden.

Arbeiten von September 2009 bis Oktober 2010

Entwicklung der SNP-Marker

Für diese Aufgabe war im Projekt DHTT vorgesehen. Der Fortschritt dieser Arbeiten lag von Anfang an erheblich hinter der Planung zurück. Bis Oktober 2010 wurden ca. 90 DNA-Fragmente identifiziert, die SNPs enthalten sollten. Auf dem ersten Workshop in Grosshansdorf am 02.11.2010 wurde das weitere Vorgehen hierzu eingehend diskutiert.

Erste Phase der Stichprobenentnahme

Zu Anfang des Projekts wurde ein Protokoll zur Stichprobennahme entwickelt. Das Protokoll wurde allen an der Stichprobennahme beteiligten Partnern übermittelt und erläutert. Neben DHTT waren bis Oktober 2010 das französische Forschungs- und Entwicklungsinstitut CIRAD in Neukaledonien und das Tropische Herbarium in Australien daran beteiligt. Im September 2010 führte Céline Blanc-Jolivet mit Unterstützung von DHTT eine 10-tägigen Stichprobennahme in Papua durch. Bis Oktober 2010 wurden insgesamt 402 Individuen aus 12 Populationen beprobt. Darunter waren drei Populationen mit 104 Individuen, die eindeutig als *Intsia bijuga* identifiziert wurden. Eine Population mit 50 Individuen konnte eindeutig als *Intsia palembanica* klassifiziert werden und bei 248 Individuen aus 8 Populationen wurde bei der Probennahme nicht zwischen *Intsia bijuga* und *Intsia palembanica* differenziert. Bis Oktober 2010 konzentrierte sich die Stichprobennahme hauptsächlich auf Papua und Papua New Guinea.

Genetische Inventuren mit nSSRs und SNPs

Im Labor des Thünen-Instituts für Forstgenetik konnte zunächst die Anwendung von 11 Mikrosatelliten (nSSRs) für Merbau optimiert werden. Diese Genmarker wurden erfolgreich an einem Teilkollektiv bestehend aus Proben von *Intsia bijuga* und *Intsia palembanica* getestet.

Arbeiten von November 2010 bis Februar 2012

Workshop Hamburg

Am 02.11.2010 wurde ein Workshop zum Stand der Arbeiten und zum weiteren Vorgehen am Thünen-Institut für Forstgenetik in Grosshansdorf durchgeführt. An dem Workshop nahmen die folgenden 8 Personen teil:

Dr. Céline Blanc-Jolivet (wissenschaftliche Angestellte im Projekt); Prof. Andrew Lowe (Universität Adelaide, Australien); Dr. Birgit Kersten (Bioinformatikerin am Thünen-Institut für Forstgenetik), Shankar Iyerh (Double Helix Tracking Technologies, Singapur), Gary Hill (Double Helix Tracking Technologies, UK), Dr. Bernd Degen (Thünen-Institut für Forstgenetik), Dr. Aki Höltken (Plant Genetic Diagnostics GmbH), Torsten Hinrichs (BMELV), Ulrike Neumann (BLE).

Auf dem Workshop wurden kritische Ergebnisse zum Ploidiegrad von Merbau vorgestellt. Danach hatte ein großer Teil der genetisch untersuchten Merbau-Bäume einen mehr als doppelten Chromosomensatz. Dies kann die Anwendung der Kernmikrosatelliten als Genmarker erschweren bzw. ganz unmöglich machen. Als Alternative wurde daher die Entwicklung von Chloroplasten-Genmarkern beschlossen. Ein weiterer wichtiger Beschluss des Treffens war es, die Entwicklung der SNP-Genmarker mit der DNA von 5 Individuen mit Hilfe eines neuartigen Sequenzierungsverfahrens (RAD-Sequenzierung) zu wiederholen.

Im Anschluss an die Veranstaltung in Großhansdorf nahm die Gruppe an einem Workshop zum Thema Holzherkunftsidentifizierung in Eschborn teil und vertiefte dort die Diskussionen zum Thema.

Entwicklung der SNP-Marker

Ein erster Anlauf 2009/2010 mit einer 454-Sequenzierung hatte nicht zur Identifizierung von SNP-Genmarkern geführt. Die Daten dieser Sequenzierung konnten jedoch erfolgreich genutzt werden, um für Merbau eine fast vollständige DNA-Sequenz des Chloroplasten zu erstellen. Diese Chloroplasten-Sequenz war für die weitere Entwicklung von Genmarkern sehr hilfreich. Im September 2011 wurde die DNA von 5 Merbau-Individuen zur Firma GenXPro (Frankfurt a. M.) geschickt, um mit Hilfe einer neuen Methode (RAD-Sequenzierung) SNPs zu entwickeln. Hierbei wurden bis zu 25 Millionen 40-Basenpaaren lange DNA Fragmente pro Individuum sequenziert und ca. 20.000 potenzielle SNPs identifiziert. Bei der Überprüfung von 100 ausgewählten potentiellen SNPs im Labor in Großhansdorf konnten jedoch nur wenige SNPs bestätigt werden. Die allermeisten potentiellen SNPs waren das Ergebnis von Fehlern bei der DNA-Sequenzierung bzw. der darauf aufbauenden bioinformatischen Datenauswertung.

Zweite Phase der Stichprobenentnahme

Bis Februar 2012 wurden insgesamt 2607 Individuen aus 48 Populationen beprobt. An verschiedenen Orten waren beide Baumarten vorhanden und wurden dann auch gesammelt. Für die Probennahme nach Februar 2012 verblieben nur wenige Lücken im Verbreitungsgebiet von *Intsia spp.* (Peninsular Malaysia und Sarawak).

Genetische Inventuren mit nSSRs und SNPs

Im Labor des Thünen-Instituts für Forstgenetik konnte bis Februar 2012 die Anwendung von 17 Mikrosatelliten (nSSRs) für Merbau optimiert werden. Zudem wurden Genmarker für 10 Chloroplast-Regionen entwickelt. Bis dato wurden ca. 20% der Individuen mit diesen Genmarkern inventarisiert.

Workshop Singapur

Am 14.02.2012 fand ein zweiter Workshop zum Stand der Arbeiten und zum weiteren Vorgehen bei DHTT in Singapur statt. An dem Workshop nahmen die folgenden 6 Personen teil:

Dr. Céline Blanc-Jolivet (wissenschaftliche Angestellte im Projekt); Prof. Andrew Lowe (Universität Adelaide, Australien); Dr. Bernd Degen (Institut für Forstgenetik, vTI); Darren Thomas (Double Helix Tracking Technologies, Singapur); Shankar Iyerh (per Telefon, Double Helix Tracking Technologies, Singapur); Dr. Birgit Kersten (per Telefon, Bioinformatikerin am Institut für Forstgenetik, vTI).

Auf dem Workshop wurden insbesondere Details zur verbleibenden Stichprobennahme und zur abschliessenden Entwicklung der SNPs besprochen.

Arbeiten von März 2012 bis Mai 2013

Stichprobennahme

Die verbleibenden Lücken in der Stichprobennahme wurden geschlossen. Insgesamt wurden 2707 Individuen aus 51 Populationen beprobt. Die ursprüngliche Planung für die beiden Arten *Intsia bijuga* und *Intsia palembanica* jeweils 30 Populationen mit 50 Individuen zu beproben, wurde damit nicht ganz erreicht. Diese Abweichung vom ursprünglichen Stichprobendesign ist unkritisch, da sich bei der ersten Phase der genetischen Inventuren bereits gezeigt hat, dass die geographische Herkunft für die genetische Zusammensetzung der Merbau-Populationen viel wichtiger ist als die Artzugehörigkeit. Gleiches gilt für die Stichprobennahme auf

Neukaledonien. Die dortigen Merbau Bäume waren alle mit *Intsia bijuga* identisch. Deswegen wurde dort auch nur eine Population beprobt.

Entwicklung SNP Genmarker

Schließlich konnten im Projekt 4 SNP Genmarker im Chloroplasten und 6 SNP Genmarker im Zellkern entwickelt werden.

Genetische Inventuren

Genetische Inventuren wurden für die Kernmikrosatelliten an den diploiden Individuen durchgeführt. Für die Chloroplasten Genmarker und die SNPs wurden genetische Inventuren an Individuen aus 41 Populationen durchgeführt.

Referenzdatenbank

Wie geplant wurde eine SQL Datenbank mit den Referenzdaten erstellt.

Praxistests

Beide Praxistests (PGD und DHTT) wurden durchgeführt

Abschlussworkshop in Singapur

Am 14.12.2013 fand in Singapur der Abschlussworkshop zum Merbau-Projekt statt. Daran haben 11 Personen teilgenommen.

Netzwerkbildung

Die Bearbeitung des Projekts war das Ergebnis eines internationalen Netzwerkes. Die Arbeiten des Projekts und der Einsatz von Genmarkern zur Holzherkunftsidentifizierung wurde von den Projektteilnehmern auf zahlreichen nationalen und internationalen Veranstaltungen vorgestellt. Zudem haben sich die Projektteilnehmer sehr aktiv am Aufbau des „Global Timber Tracking Networks“ bei Bioversity International beteiligt.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Vorkommen Merbau und illegaler Holzeinschlag

Merbau (*Intsia spp.*) ist eine wichtige tropische Wirtschaftsbaumart, die aufgrund ihrer hervorragenden technologischen Eigenschaften und hohen natürlichen Dauerhaftigkeit (Dauerhaftigkeitsklasse 1) gegenwärtig weltweit stark nachgefragt wird (insbesondere in der Außenverwendung und für anspruchsvolle Parkettböden). Die hohe Nachfrage führt dazu, dass nachweislich große Mengen Merbau illegal eingeschlagen werden (Cheung et al. 2007). Aufgrund der starken Übernutzung und des illegalen Holzeinschlags steht Merbau aktuell unter CITES-Beobachtung. Das bedeutet, dass der Warenhandel beobachtet wird, um evtl. Maßnahmen für eine CITES-Listung zu treffen. Gemäß der Taxonomie des „Germplasm Resources Information Network“ (GRIN) werden drei *Intsia*-Arten unterschieden: *Intsia bijuga*, *Intsia palembanica* und *Intsia moeleri*. Letztere soll ausschließlich auf Neukaledonien vorkommen und spielt im internationalen Holzhandel keine Rolle. *I. bijuga* und *I. palembanica* sind beide weit in Südostasien verbreitet (Abb. 2): *I. bijuga* kommt zusätzlich auf Madagaskar und in Ostafrika sowie in Ozeanien vor, *I. palembanica* dagegen ausschließlich in Südostasien (Soerianegara & Lemmens 1998).

Untersuchungen zum Handelsvolumen der letzten Jahre zeigen, dass China mit ca. 145.000 bis 920.000 m³ Merbau zwischen 2003 und 2005 zu den Haupteinfuhrländern dieser Holzart aus SO-Asien zählt. Laut „China Customs Statistics“ stammt der überwiegende Teil mit Spitzenwerten von über 870.000 m³ im Jahre 2004 aus Malaysia, was aber aufgrund der

geringen Merbau-Produktion in den malaysischen Gebieten unmöglich erscheint. Von 2000 bis 2004 betrug die jährliche Stammholzproduktion auf der Halbinsel Malaysia lediglich 63.000 bis 92.000 m³, in den Provinzen Sabah und Sarawak auf der Insel Borneo weniger als 50.000 bis 80.000 m³ (Cheung et al. 2007).

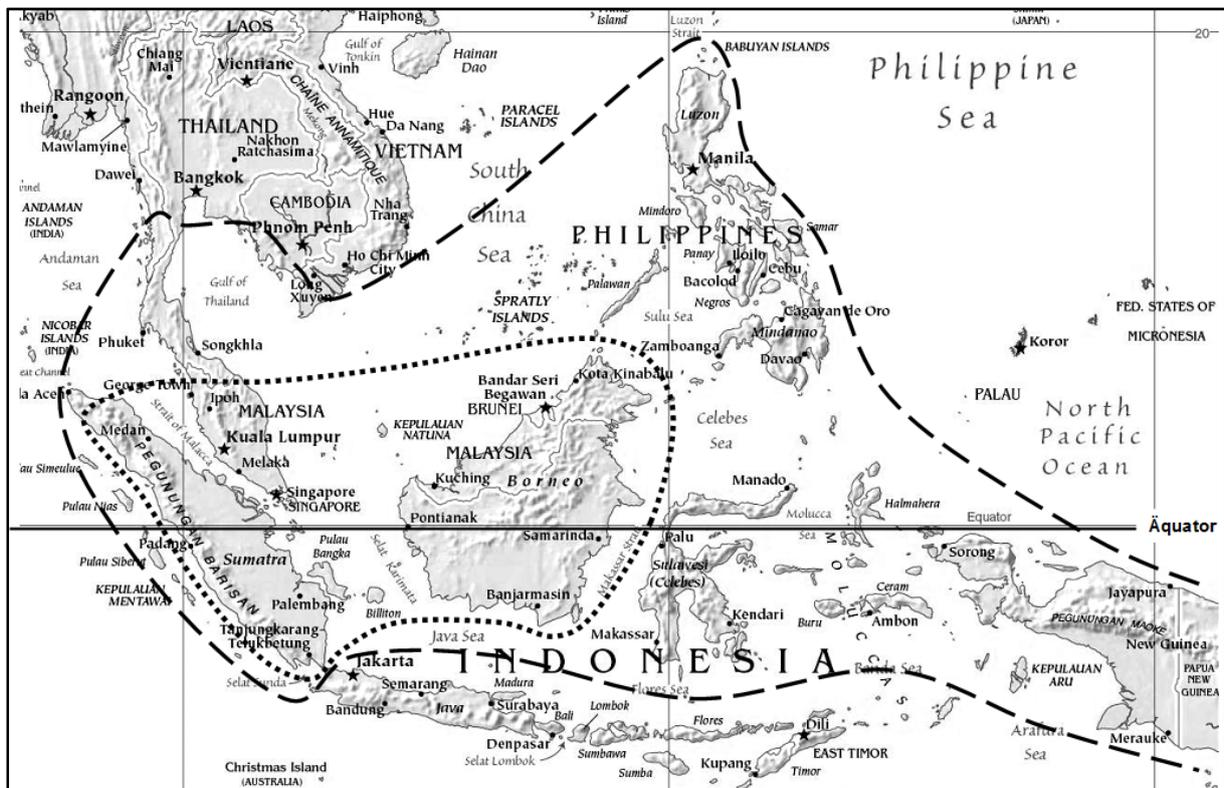


Abbildung 2: Natürliches Verbreitungsgebiet der beiden Merbau-Arten *Intsia bijuga* [— —] und *I. palembanica* [•••] (nach Drahms 1982, Seite 210, verändert)

Diese Zahlen untermauern die Vermutung, dass trotz gesetzlicher Restriktionen große Mengen an illegal geschlagenem Merbau von Indonesien nach China exportiert werden. Dies geschieht meist mit gefälschten Papieren, die Malaysia statt Indonesien als Herkunftsland deklarieren (vgl. auch einen Artikel von Greenpeace, Cheung et al. 2007). Somit wird das durch die indonesische Regierung im Jahre 2001 verhängte Exportverbot für Stammholz umgangen, das die immensen Holzeinschläge, insbesondere in der indonesischen Provinz Papua, stoppen sollte. Hier kam es zwischen den Jahren 1998 und 2001 zu einer Exportsteigerung um mehr als das 10-fache von geschätzten 50.000 m³ auf über 660.000 m³ Merbau.

Zusätzlich wird aber auch weiterverarbeitetes Holz weiterhin legal aus Indonesien exportiert. Hierbei werden teilweise nur die Flanken der Stämme entnommen und aus dem Rundholz Quader von 2 bis 6 Meter Länge zurechtgeschnitten, was den Abtransport in Containern als „Schnittware“ ermöglicht und somit Zollkontrollen vielfach umgeht (Cheung et al. 2007). Dies wird unter anderem auch durch die Handelszahlen innerhalb der einzelnen indonesischen Provinzen bekräftigt. Sie machen ein Gesamtvolumen von 257.000 m³ an Merbau aus, wobei über 90% dieses Volumens aus den Provinzen Papua und Irian Jaya zum Zwecke der Weiterverarbeitung in andere indonesische Provinzen (Java, Maluku, Sulawesi) exportiert werden (Cheung et al. 2007).

Ein weiterer wichtiger Exporteur von Merbau ist Papua Neu Guinea (PNG). Hier kam es in den Jahren 2003 bis 2006 ebenfalls zu starken Ausfuhrsteigerungen von ca. 9.000 m³ auf nahezu 90.000 m³ Merbau, wobei auch hier China als Hauptabnehmer für Rohholz auftritt. Aufgrund der Erkenntnisse unabhängiger Prüfungskommissionen (finanziert durch die Welt-

bank in den Jahren 2000-2005) erfüllen große Teile des geschlagenen Holzes nicht die gesetzlichen Richtlinien und Auflagen, so dass auch hier mit einem größeren Anteil an illegal geschlagenem Holz zu rechnen ist (Quelle: Forest Trends 2006). Der Schwerpunkt des illegalen Holzeinschlages bei Merbau ist demnach eindeutig die Insel Neu Guinea mit dem indonesischen Teil im Westen (Papua, Irian Jaya) und dem Staat Papua Neu Guinea im Osten. Mit einer Einfuhr von über 50.000 m³ im Jahre 2005 (gemessen in Rohholz-Äquivalenten) ist die Europäische Union der zweitwichtigste Importeur von Merbau. Nahezu 60% dieses Handelsvolumens fielen auf die Niederlande (16.500 m³), Deutschland (7.500 m³) und Belgien (5900 m³). Die Hälfte dieses Volumens stammt vermutlich aus Indonesien, das von dort in Form von fertig bearbeiteten Holzprodukten (Parkett) oder halbfertigen Waren (z.B. als Türen) geliefert wird (Cheung et al. 2007). Aber auch innerhalb der einzelnen EU-Länder wird mit importierten Merbau gehandelt. Hier kommt der Bundesrepublik Deutschland mit einem Import-Volumen von über 3000 m³ Holz, das aus anderen EU-Ländern zum Zwecke der Weiterverarbeitung eingeführt wird, die größte Bedeutung zu.

Herkunftsidentifizierung bei Bäumen

International und EU

Einen Überblick zu Ansätzen und Ergebnissen der Holzarten- und Holzherkunftsidentifizierung zum Zeitpunkt des Projektbeginns geben die Proceedings eines Workshops zu diesem Thema, der im Oktober 2007 in Bonn stattfand (Degen 2008). Zuvor wurden im September 2007 in Japan auf einem internationalem Symposium Ergebnisse zur Entwicklung von Methoden zur Holzidentifizierung von Shorea-Arten präsentiert. Hierbei wurde genau wie bei dem Workshop in Bonn sowohl die Entwicklung von Methoden zur Isolierung von DNA aus Holz, der Einsatz molekulargenetischer Methoden sowie stabiler Isotope zur Bestimmung der geografischen Herkunft als auch die Erstellung von Datenbanken berücksichtigt (Fujii 2007).

Von den privaten Unternehmen in diesem Bereich sind die Aktivitäten der Firma „Double Helix Tracking Technologies (DHTT)“ mit Sitz in Singapur besonders weit fortgeschritten. DHTT bietet eine Zertifizierung der Holzherkunft auf genetischer Grundlage (Certisource) an. Über die Erstellung von genetischen Fingerabdrücken für Bäume/Holz in konzessionierten Flächen/Regionen soll es ermöglicht werden, die Herkunft von gehandelten Hölzern zurückzuverfolgen. In Australien gibt es bereits eine Zusammenarbeit zwischen dem Importeur von Hölzern aus Indonesien (Simmonds-Lumber) und der oben genannten Aktivität von DHTT zur genetischen Charakterisierung dieser Hölzer. Certisource hat sich hierbei auf Merbau konzentriert. Wegen dieser laufenden Aktivitäten von DHTT war es wichtig, DHTT in das Vorhaben einzubinden.

Unter Koordinierung des „Institute National de la Recherche Agronomique“ (INRA) in Frankreich wurden vor über 10 Jahren erstmals genetische Daten zur Rekonstruktion der Rückwanderungswege der Eiche im Rahmen eines EU-Projekts erstellt. Die gewonnenen Daten wurden bereits mehrfach genutzt, um die Herkunft von Eichenholz zu überprüfen, das u.a. für den Bau von Holzfässern verwendet wird. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden war es Petit und Mitarbeiter möglich nachzuweisen, dass das für die Eichenfässer verwendete Holz entgegen der Deklaration in den Frachtpapieren häufig nicht aus französischen Wäldern stammte, sondern importiert wurde (Deguilloux et al. 2002).

In England hat ein Unternehmen (Wildlife DNA Services; Rob Ogden, Bangor, England) seinen Sitz, das in den Bereichen Wildlife Forensics, Wildlife Genetics und Food DNA Services analytische Dienstleistungen anbietet. Der Fokus des Unternehmens lag zum damaligen Zeitpunkt im Bereich der genetischen Analytik von Tieren mit Fragestellungen zur

Artidentifikation, Identifikation von Individuen, geographischen Herkünften bzw. Elternschaftsanalysen. Das Unternehmen strebte den Ausbau seiner analytischen Dienstleistung im Bereich der Identifikation von Holzarten an. Der erfolgreiche Einsatz von molekularen Markern zum Zweck der Artidentifizierung am Beispiel von Raminholz (*Gonystylus bancanus*) wurde durch das Unternehmen auf dem Workshop in Königswinter präsentiert. Im Rahmen einer Kooperation zwischen Forschern aus Wageningen (Niederlande) und Sarawak (Malaysia) wurden ebenfalls für Ramin Kernmikrosatelliten als Genmarker für die geographische Herkunftskontrolle entwickelt (Smulders et al. 2008).

In einer Abfolge von zwei EU-INCO Projekten (Geneotropico und SEEDSOURCE) wurden in Kooperation zwischen verschiedenen europäischen und lateinamerikanischen Instituten umfangreiche genetische Daten erarbeitet, die zur Herkunftsgrenzung tropischer Baumarten genutzt werden können. Zu nennen sind insbesondere Ergebnisse zu genetischen Unterschieden bei *Swietenia macrophylla* in Brasilien und Mittelamerika sowie *Cedrela odorata* in Mittelamerika (Cavers et al. 2004; Lemes et al. 2003; Novick et al. 2003; Young, K. R., 2003).

National

In dem vom BMELV geförderten Projekt (03HS047) „Die Eignung molekularer Marker zur Identifikation der örtlichen Herkunft bei Baumarten der Tropen“ wurden an der Universität Göttingen verschiedene Shorea-Arten in Südost-Asien untersucht. Als Marker wurden bei den Arbeiten AFLPs, Cp-DNA Marker und SCAR-Marker eingesetzt. Das Projekt konnte Fortschritte bei der genetischen Artabgrenzung der Shorea-Arten (Indrioko et al. 2006) und bei der DNA-Extraktion aus Holz erzielen (Rachmayanti et al 2006), zum eigentlichen Projektziel der örtlichen Herkunftskontrolle wurden jedoch kaum Beiträge geleistet (Cao et al. 2006). Das Hauptproblem hierfür war die komplizierte Taxonomie der Gattung Shorea mit dutzenden von verschiedenen Arten. Grundlage der genetischen Herkunftskontrolle ist das Vorhandensein eines räumlich-genetischen Musters. Da die räumlich-genetischen Muster bei den meisten Arten verschieden sind, setzt der Einsatz von Genmarkern zur Herkunftskontrolle Klarheit über die Artzuordnung voraus.

Im Rahmen einer kooperativen Pilotstudie zwischen dem Thünen-Institut für Forstgenetik (ehemals BFH) und der Firma Agroisolab zur Bestimmung von Holzherkünften bei der Fichte wurden vergleichende Analysen mit Hilfe des genetischen Fingerabdrucks, der Elementzusammensetzung durch ICP-Analytik (Inductively Coupled Plasma) sowie der Isotopenanalyse durchgeführt. Ausgangsmaterial für die Versuche waren Fichtenklone aus Deutschland sowie der Slowakei und Rumänien. Das Ergebnis der Studie zeigte, dass eine Herkunftsdifferenzierung sowohl mit Hilfe der Isotopenmethode als auch mit Hilfe genetischer Analysen sehr gut möglich ist. Eine optimale Aussagekraft hinsichtlich der Herkunftsdifferenzierung ist über eine kombinierte Anwendung beider Methoden möglich (http://www.bfafh.de/bibl/pdf/ii_06_01.pdf).

In der Abteilung Holzbiologie der Universität Hamburg wurden im Rahmen einer Diplomarbeit Marker zur molekulargenetischen Identifikation von CITES-Holzarten und ihren Austauschhölzern aufgrund der ITS-Region des Kerngenoms erarbeitet. Inzwischen liegen Methoden vor, die die Extraktion von intakter, amplifizierbarer DNA aus Blattgeweben, lebenden Splintholzgeweben, Kernholzgeweben und auch aus Holzproben, die seit Jahrzehnten gelagert wurden, ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden u.a. für *Terminalia superba*, *Pterygota spp.* und *Gonystylus spp.* art- und gattungsspezifische Primer erstellt (Vay 2008). Diese ermöglichen eine eindeutige Identifizierung dieser Baumarten.

In einem von der DBU finanzierten Vorhaben hatte die Firma Agroisolab in Zusammenarbeit mit dem WWF die Frage bearbeitet, inwieweit mittels stabiler Isotopen eine Überprüfung der Herkunftsdeklaration von importiertem Holz möglich ist. Ergebnisse dieses Projekts wurden durch beteiligte Projektpartner auf dem Workshop in Königswinter präsentiert (Boner et al. 2008). Die Untersuchungen wurden an Nadel- und Laubholzproben in Nordeuropa und Westrussland sowie mit Holzproben tropischer Baumarten in Südost-Asien durchgeführt. Die Isotopenpaare D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ erbrachten in den borealen Wäldern brauchbare Ergebnisse zur Herkunftsabgrenzung.

Zu Beginn des Vorhabens lief ein weiteres DBU-Vorhaben unter Beteiligung der Firma Agroisolab, des WWF und der Universität Hamburg an. Ziel war es hierbei ein praxistaugliches Verfahren zur Identifizierung der Herkunft von Rund- oder Schnittholz für die Holzarten Mahagoni (drei *Swietenia*-Arten) und Teak (*Tectona grandis*) zu entwickeln. Das Institut für Weltfortwirtschaft der Universität Hamburg erarbeitete hierbei zusammen mit dem Thünen-Institut für Forstgenetik die Artabgrenzung mit Hilfe des genetischen Barcodings (für die drei *Swietenia*-Arten sowie für die Austausch-Mahagoniarten *Entandrophragma* sp., *Khaya* sp. und *Carapa* sp. siehe auch Höltken et al. 2012).

2 Material und Methoden

2.1 Stichprobennahme von Merbau im Verbreitungsgebiet

Wir planten eine zweistufige Stichprobennahme. Zunächst sollten für die Baumarten *Intsia palembanica* und *Intsia bijuga* Stichproben von jeweils 10 über das gesamte Verbreitungsgebiet der Arten verteilten Populationen gewonnen werden. In jeder Population sollten Gewebeprobe (Blätter oder Kambium) von jeweils mindestens 50 Individuen gesammelt werden. An diesen 1000 Proben sollten von der Universität Hamburg die genetischen Inventuren mit den nSSRs und von DHTT die genetischen Inventuren mit SNPs durchgeführt werden.

Die Daten dieser ersten genetischen Inventuren sollten dann auf die vorhandenen genetischen Muster und die Brauchbarkeit für die Multilocus-Genotyp-Zuordnungen überprüft werden. Dann wollten wir entscheiden, mit welchen Genmarkern die verbleibenden 20 Populationen genetisch untersucht werden sollten. Hierbei sollten die Genmarker mit den besten Erfolgsaussichten für den Herkunftsnachweis verwendet werden. Bei dieser zweiten Stichprobennahme sollte die Verteilung der beprobten Populationen an das bisher gefundene räumlich-genetische Muster angepasst werden. Auch in der zweiten Phase der Stichprobennahme sollten in jeder Population mindestens 50 Individuen beprobt werden.

Die Art *Intsia moeleri* stellte eine besondere Situation dar: Die Art spielt beim internationalen Holzhandel keine Rolle. Zudem gibt es unter den Taxonomen keine Einigkeit darüber, ob dies überhaupt eine eigenständige Art ist. Sie soll ausschließlich in Neukaledonien vorkommen. Vor diesem Hintergrund planten wir zunächst zwei möglichst weit voneinander entfernte Populationen der *Intsia*-Bäume auf Neukaledonien zu beproben und auf genetische Unterschiede zu *Intsia bijuga* bei Kernmikrosatelliten hin zu untersuchen. In jeder Population sollten mindestens 50 Bäume beprobt werden.

2.2 Entwicklung neuer Genmarker und genetische Inventuren

Wir wollten in der Pilotstudie den Ansatz der Multilocus-Genotyp-Zuordnung testen. Für die beprobten Individuen wurden der Multilocus-Genotyp an mehreren Kernmikrosatelliten (nSSRs) und „Single-Nucleotid-Polymorphism“ (SNPs) bestimmt. Diese Daten dienten in der späteren Auswertung als „Referenzdatensatz“. Anschließend wurden dieselben Genmarker benutzt, um die Multilocus-Genotypen von Proben unbekannter oder fraglicher Herkunft zu bestimmen. Mit bereits entwickelten statistischen Auswerteprogrammen wurde dann für die unbekanntenen Proben eine Zuordnung zu den verschiedenen Populationen des Referenzdatensatzes vorgenommen.

2.2.1 Kernmikrosatelliten (nSSRs)

Mehr als 20 nSSRs wurden bereits vor Beginn des Projekts von der Firma Double Helix Tracking Technologies (DHTT) in Zusammenarbeit mit der Universität Singapur für *Intsia* entwickelt (Wong et al. 2008 und nicht veröffentlichte Daten). Fünfzehn nSSRs davon wurden für die Genotypisierung in diesem Projekt ausgewählt. Diese Genmarker wurden aufgrund ihrer hohen genetischen Variation und zuverlässigen Reproduzierbarkeit selektiert.

2.2.2 Chloroplasten Marker

Verschiedene universale Chloroplasten Marker (Shaw et al. 2005; Taberlet et al. 1991; Weising & Gardner 1999) wurden auf Sequenzvariationen hin untersucht. Es wurden daraus für die genetischen Inventuren Genmarker entwickelt, die möglichst kurze DNA Fragmente amplifizieren. Je kürzer das zu analysierende DNA-Fragment war, umso größer sind die Erfolgsaussichten bei der Anwendung von degradiertem DNA des Holzes.

2.2.3 „Single-Nucleotid-Polymorphism“ (SNPs)

Für die Entwicklung von SNPs war im Projekt der Unterauftragnehmer DHTT zuständig. Ein erster Anlauf 2009/2010 mit einer 454-Sequenzierung hat nicht zur Identifizierung von SNP-Genmarkern geführt. Die Daten dieser Sequenzierung konnten jedoch erfolgreich genutzt werden, um für Merbau eine fast vollständige DNA-Sequenz des Chloroplasten zu erstellen. Diese Chloroplasten-Sequenz war für die weitere Entwicklung von Genmarkern sehr hilfreich. In einem zweiten Anlauf wurde im September 2011 die DNA von 5 Merbau-Individuen zur Firma GenXPro (Frankfurt a.M.) geschickt, um mit Hilfe einer neuen Methode (RAD-Sequenzierung) SNPs zu entwickeln. Hierbei wurden bis zu 25 Millionen 40-Basenpaare lange DNA Fragmente pro Individuum sequenziert und ca. 20.000 potenzielle SNPs identifiziert. Nach verschiedenen Selektionsschritten konnten wir schließlich 6 SNPs des Zellkerns für die weiteren genetischen Inventuren entwickeln. Hinzu kamen 4 SNPs, die wir für den Chloroplasten entwickelt haben.

2.3 Daten Auswertung

Als Parameter für die genetische Diversität wurde die effektive Anzahl Allele berechnet. Dieser Wert ist unempfindlich gegenüber Schwankungen in der Stichprobengröße, da er neben der absoluten Anzahl an Allelen bzw. Haplotypen auch deren Häufigkeit berücksichtigt. Die genetische Unterschiedlichkeit zwischen Populationen quantifizierten wir mit dem genetischen Abstand nach Gregorius (Gregorius, 1974) und dem Differenzierungsmaß Delta (Gregorius 1996) sowie dem Fixierungsindex F_{ST} und dem normierten F_{ST} (Hedrick 2005). Statistische Signifikanz wurde durch Permutation ermittelt. Die Berechnungen wurden mit den Computerprogrammen Fstat v. 2.9.3.2 (Goudet, 1995) und GDA_NT (Degen, unveröffentlicht) durchgeführt.

Wir nutzten das Programm Structure v 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) für bayesische Clusteranalysen. Dabei ermittelt das Programm zunächst zu wie vielen verschiedenen Clustern (= Genpools) die Individuen der analysierten Gruppe gehören und ordnet anschließend jedes einzelne Individuum einem oder mehreren Clustern zu. Die Cluster werden in Ausgabegraphiken als unterschiedliche Farben dargestellt und können dann als verschiedene Arten oder genetisch einheitliche Gruppe interpretiert werden.

Zur Veranschaulichung der räumlich genetischen Muster haben wir basierend auf genetischen Abständen zwischen den Häufigkeiten der Allele bzw. Haplotypen mit dem Programm Past (Hammer et al. 2006) Cluster Analysen berechnet. Die Signifikanz der einzelnen Cluster wurde durch Permutationen ermittelt. Die Ergebnisse der Clusteranalyse wurde in Dendrogrammen veranschaulicht.

Die statistische Herkunftskontrolle der einzelnen Individuen bzw. Gruppen von Individuen wurde mit dem Ansatz der Multilocus-Genotyp-Zuordnung durchgeführt. Dieser Ansatz konnte bereits bei verschiedenen Tieren (Narum et al. 2008) und Pflanzen (Honjo et al. 2008) erfolgreich zur geographischen Herkunftskontrolle eingesetzt werden. Hierbei werden zunächst über das zu untersuchende Verbreitungsgebiet der Baumart Stichproben in einzelnen Populationen genommen und für die beprobten Individuen der Multilocus-Genotyp an mehreren Kernmikrosatelliten (nSSRs) und „Single-Nucleotid-Polymorphism“ (=SNPs) bestimmt. Diese Daten dienen in der späteren Auswertung als „Referenzdatensatz“. Anschließend werden dieselben Genmarker benutzt, um die Multilocus-Genotypen von Proben unbekannter oder fraglicher Herkunft zu bestimmen. Für die Zuordnung werden Wahrscheinlichkeiten ermittelt. Die unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten bei der Zuordnung der fraglichen Individuen zu Populationen der Referenzdaten basieren auf Ähnlichkeiten und Unterschieden bei den Häufigkeiten von Allelen bzw. Haplotypen der untersuchten Genorte (Rannala & Mountain 1997). In der englischsprachigen Literatur wird dieses Verfahren „Multilocus-Genotype-Assignment“ genannt. Als Auswerteprogramm nutzten wir die Software „GeneClass2“ (Piry et al. 2004).

2.4 Optimierung der DNA-Extraktion

Ausgehend von bestehenden DNA-Extraktionsprotokollen wurden systematisch frische und unterschiedlich alte, sowie unterschiedlich behandelte Holzproben, mit schrittweise modifizierten Extraktionsroutinen behandelt.

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Stichprobennahme Referenzproben

Zu Anfang des Projekts wurde ein Protokoll zur Stichprobennahme entwickelt. Das Protokoll wurde allen an der Stichprobennahme beteiligten Partnern übermittelt und erläutert. Neben DHTT waren das französische Forschungsinstitut CIRAD in Neukaledonien, das Tropische Herbarium in Australien, SNGF (Silo National des Graines Forestières) in Madagaskar, und Herr Ben Hayes (UK) an der Stichprobennahme beteiligt. Es wurden insgesamt 2707 Individuen aus 51 Populationen beprobt (Abb. 3). Mit Ausnahme einiger Stichproben aus Papua, konnte für jedes Individuum zwischen *Intsia bijuga* und *Intsia palembanica* morphologisch unterschieden werden. An verschiedenen Orten waren beide Baumarten

vorhanden und wurden dann auch beprobt. In Papua und Singapur wurden auch Samen gewonnen und im Gewächshaus des Thünen-Instituts für Forstgenetik ausgesät (Abb. 4 u. 5).

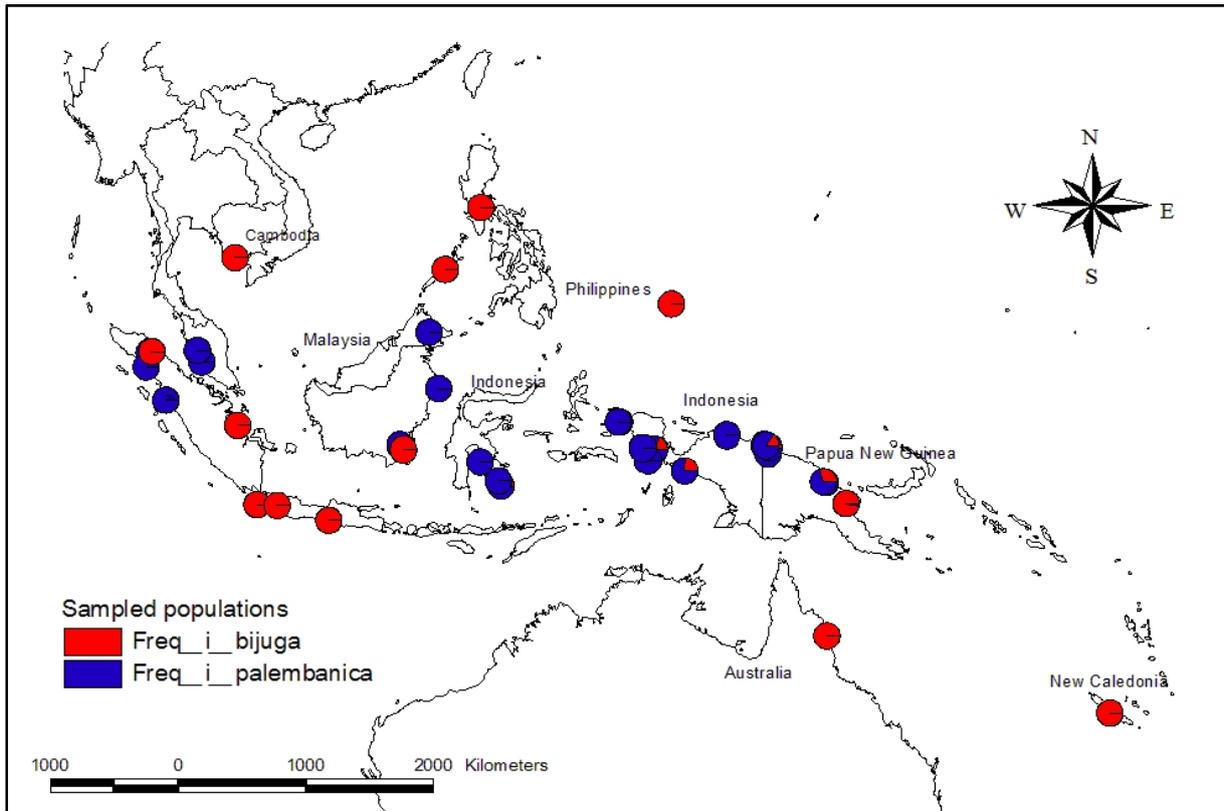


Abbildung 3: Verteilung der beprobten Merbau-Populationen (blau = *Intsia palembanica*, rot= *Intsia bijuga*). Nicht zu erkennen ist der Stichprobenpunkt in Madagaskar



Abbildung 4: *Intsia palembanica* Samen



Abbildung 5: *Intsia palembanica* Sämlinge

3.1.2 Genetische Inventuren

Kernmikrosatelliten (nSSRs)

Die genetische Inventur wurde mit 15 nSSRs an 1119 Individuen durchgeführt und es wurden dabei 695 verschiedene Genotypen gefunden. 424 Individuen zeigten an 15 Genorten Übereinstimmungen mit zuvor identifizierten Genotypen. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen an 15 Genorten denselben Genotyp zeigen, ist sehr gering. Wir vermuten daher, dass einige Individuen mehrmals beprobt wurden. Besonders stark betroffen sind Populationen aus Sumatra, Kalimantan, Sulawesi (Indonesien) und Malaysia. Für die weiteren Auswertungen wurden die doppelten Genotypen aus den Daten entfernt.

Die Untersuchung der Mikrosatelliten haben in einigen Regionen mehr als zwei DNA-Fragmente je Genort ergeben. Eine sehr wahrscheinliche Interpretation hierfür ist ein mehr als doppelter Chromosomensatz pro Individuum. Alle Auswertungsansätze und auch die hierfür entwickelte Software ist jedoch für den Standardfall eines doppelten Chromosomensatzes (diploid) entwickelt worden. Es war also wichtig, hier Klarheit zu schaffen. Ein Team am Julius Kühn-Institut (Dr. Otto Schrader) ist darauf spezialisiert, die Anzahl an Chromosomen mikroskopisch zu bestimmen. Für Sämlinge, die wir in Singapur gesammelt hatten, konnte Dr. Schrader einen diploiden Chromosomensatz nachweisen (Abb. 6). In einer weiteren Untersuchung wurde die Genomgröße der Sämlinge aus Papua und der nachweislich diploiden Sämlinge aus Singapur mit einem Flowzytometer bestimmt (Gisela Naujoks, Thünen-Institut für Forstgenetik). Dabei zeigte sich, dass die Sämlinge aus Papua vier- bis fünffach mehr DNA als die Sämlinge aus Singapur hatten. Daraus ergibt sich die Vermutung eines acht oder zehnfachen Chromosomensatzes dieser Pflanzen (Abb. 7).

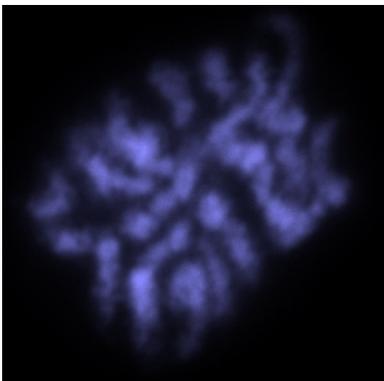


Abbildung 6: Mikroskopische Untersuchung eines *Intsia* Individuums aus Singapur

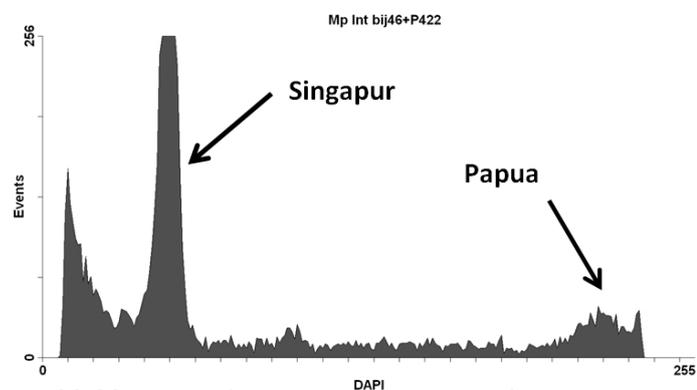


Abbildung 7: Flowzytometer Untersuchung einer gemischten *Intsia* Probe. Die Y-Achse „Events“ stellt die Häufigkeit dar und die X-Achse „DAPI“ ist ein Maß für die DNA-Konzentration gemessen als Fluoreszenzstärke

Für Individuen mit einem mehr als doppelten Chromosomensatz können die nSSR Genmarker nicht eingesetzt werden, da eine eindeutige Auswertung der Daten nicht möglich ist. So erklärt sich, dass wir von insgesamt 2707 Individuen nur für 1119 Individuen die Genotypen an den Kernmikrosatelliten bestimmen konnten. Die Verbreitung von nicht diploiden Merbau-Individuen weist eine klare räumliche Struktur im Verbreitungsgebiet auf (Abb. 8). Im Zentrum des Verbreitungsgebiets, insbesondere in Papua, fanden wir ausschließlich Individuen mit höherem Chromosomensatz, während in der Peripherie diploide Pflanzen

vorherrschten. Eine Ausnahme bildeten hier die Individuen aus Madagaskar. Auch dort wurden ausschließlich polyploide Bäume beobachtet.

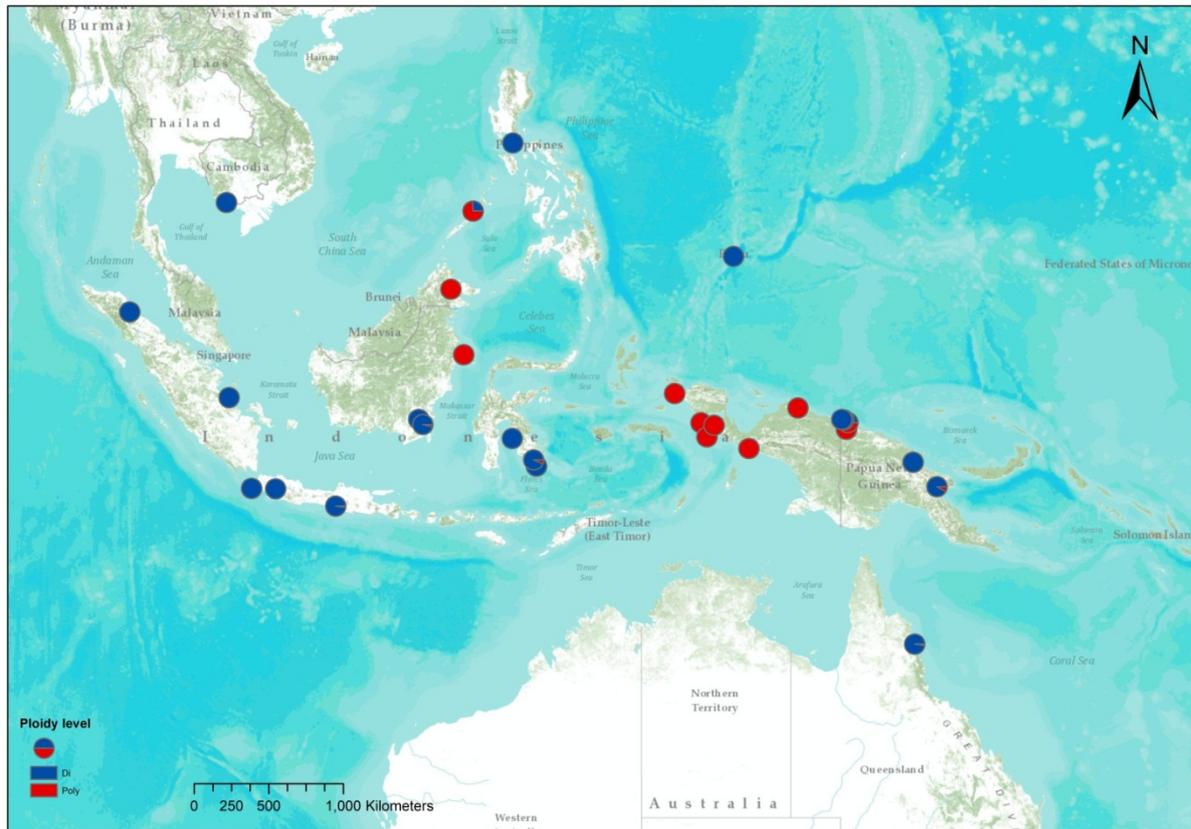


Abbildung 8: Verteilung der Individuen mit doppeltem Chromosomensatz (blau) und mehr als doppelten Chromosomensatz (rot). In Madagaskar hatten alle Individuen einen höheren Chromosomensatz.

Genetische Unterschiede zwischen den Arten

Für fünf Populationen in Sumatra und PNG, in denen beide Arten *Intsia bijuga* und *Intsia palembanica* vorkamen, wurde die genetische Struktur zwischen den beiden Arten mit der Software STRUCTURE untersucht (Abb. 9). Ferner erstellten wir basierend auf den genetischen Abständen zwischen den insgesamt 10 Teilkollektiven (5 Populationen x 2 Arten) mit Hilfe einer Clusteranalyse ein Dendrogramm, um die genetische Ähnlichkeit zu veranschaulichen (Abb. 10). Beide Auswerteverfahren kamen hierbei zu dem gleichen Ergebnis, dass die genetischen Unterschiede bei den untersuchten Mikrosatelliten-Genmarkern zwischen verschiedenen Regionen viel bedeutender waren, als die genetischen Unterschiede zwischen den beiden Arten. So haben wir bei der Analyse mit STRUCTURE nicht immer die gleiche Farbe für Individuen der gleichen Art und im Dendrogramm gibt es keine zwei Hauptäste, in denen jeweils alle Teilkollektive von *Intsia bijuga* und *Intsia palembanica* enthalten sind.

Ähnliche Ergebnisse fanden wir für die genetischen Daten der *Intsia* Individuen aus Neukaledonien. Hier gab es neben dem eindeutigen geographischen Aspekt keine signifikante Abweichung, welche die Ausweisung einer anderen Art (*Intsia moeleri*) nahelegte. Von Jérôme Munziger (Herbarium) und Laurent Maggia (CIRAD), beide als Wissenschaftler in Neukaledonien tätig, wurde uns bestätigt, dass die Arten *I. moeleri* und *I. bijuga* identisch sind.

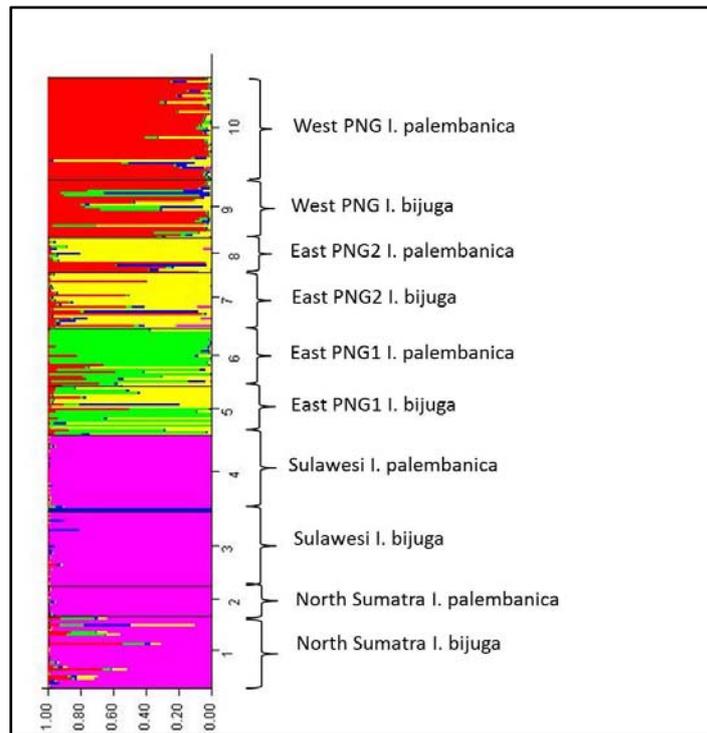


Abbildung 9: Clusteranalyse mit STRUCTURE, K = 5 Cluster, die Farben stellen die verschiedenen Cluster = Genpools dar.

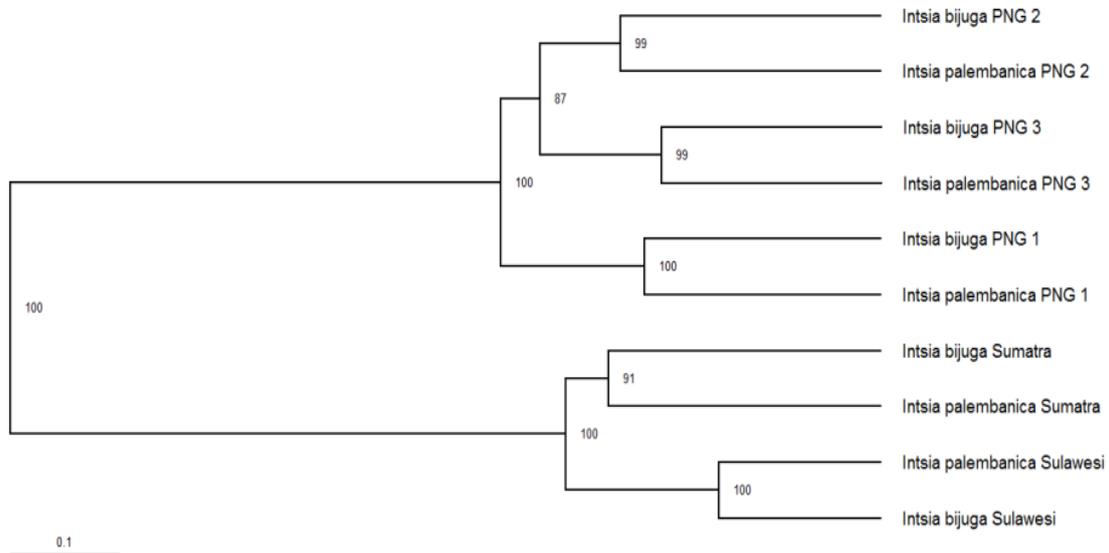


Abbildung 10: Genetische Unterschiede zwischen den zwei *Intsia* Arten, dargestellt als Dendrogramm einer UPGMA Clusteranalyse, berechnet aus den genetischen Abständen.

Immer dann, wenn die Stichprobengröße deutlich unter 50 Individuen lag, haben wir die Daten verschiedener Populationen aus der gleichen Region zusammengefasst. Auf diese Weise berechneten wir die genetische Variation und die genetischen Unterschiede zwischen 15 Kollektiven. Generell war das Niveau der genetischen Vielfalt zwischen den Populationen relativ ähnlich (Tab. 1). Auffällig war die niedrige effektive Anzahl von Allelen in Kambodscha (1.6). Die höchste genetische Variation fanden wir in Java und Süd Kalimantan (5.8 – 6.4). Die genetische Differenzierung zwischen Populationen war hoch und in allen

Kombinationen statistisch signifikant (Tab. 2). Die Clusteranalyse (Abb. 11) und die genetischen Abstände (Tab. 2) zeigten, dass insbesondere Merbau aus Kambodscha sich deutlich von allen anderen Regionen unterschied. Im restlichen Verbreitungsgebiet teilten sich die Populationen in eine West-Gruppe (Sumatra und Sulawesi) und eine Ost-Gruppe (Java, Philippinen, Papua Inseln, Palau und Kalimantan). Die Bootstrapp-Werte in Abbildung 11 zeigten in vielen Fällen eine hohe statistische Signifikanz an. Auch die Analyse mit STRUCTURE ergab eine starke genetische Differenzierung der Merbau-Individuen aus Kambodscha, Palau und den Philippinen (Abb. 12). Die Populationen in Australien und PNG waren genetisch sehr ähnlich. Interessanterweise wurden Populationen aus Sumatra und Sulawesi dem gleichen Cluster zugeordnet. In Java und Kalimantan gehörten einige Individuen zu dem Sumatra-Sulawesi Cluster (West-Gruppe) und andere zum Australien-PNG oder Philippinen Cluster (Ost- Gruppe). Das bedeutet, dass die Merbau-Bäume in Java und Süd Kalimantan einer Kontaktzone zwischen der West- und der Ost-Gruppe angehörten.

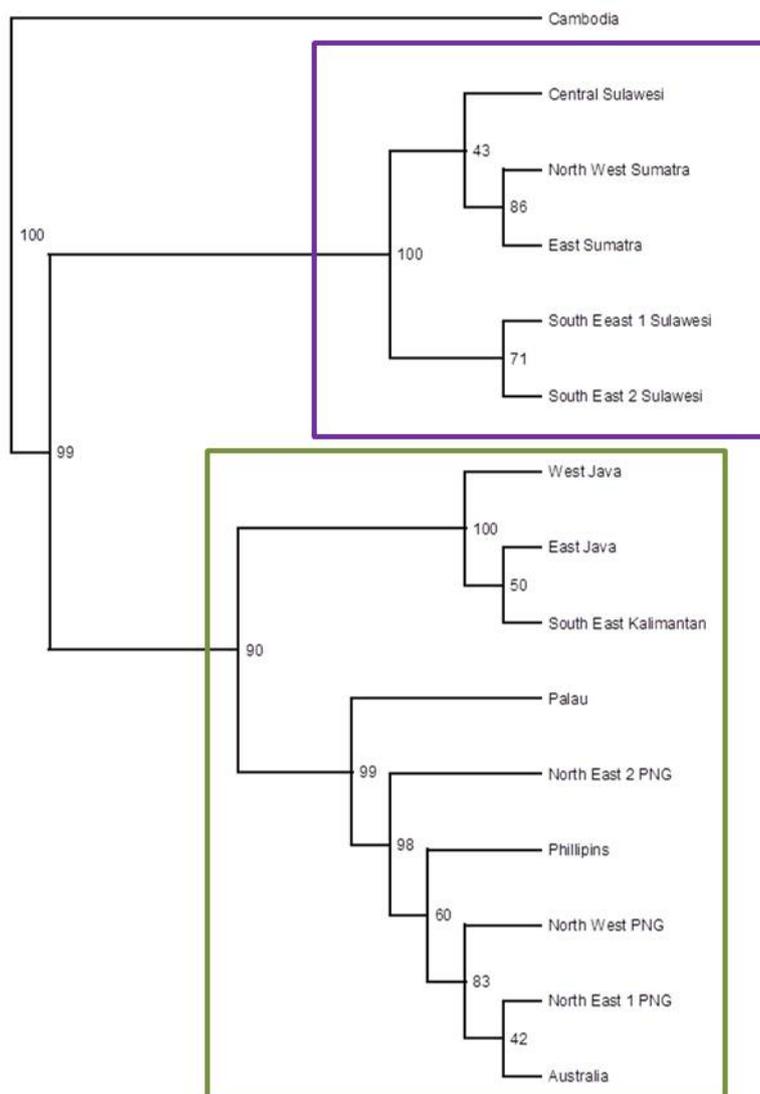


Abbildung 11: Genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen *Intsia* Populationen bei den Mikrosatelliten, dargestellt als Dendrogramm einer UPGMA Clusteranalyse, berechnet aus den genetischen Abständen. Gut zu erkennen sind zwei Gruppen, eine West-Gruppe (lila) und eine Ost-Gruppe (grün).

Genort	Kambodscha	Nord Sumatra	Ost Sumatra	West Java	Ost Java	Süd-Ost Kalimantan	Zentral Sulawesi	Süd-Ost Sulawesi 1	Süd-Ost Sulawesi 2	Philippinen	Palau	Nord-West PNG	Nord-Ost PNG 1	Nord-Ost PNG 2	Australien
D68	1.000	3.741	4.820	8.911	11.468	7.365	2.400	5.014	4.888	7.539	10.823	6.728	6.805	9.060	6.123
H22	1.173	1.049	1.186	5.345	3.779	4.170	1.000	1.879	1.321	7.945	4.263	5.037	4.487	3.959	6.194
D60	1.153	3.216	3.512	7.237	6.250	7.014	3.989	5.845	3.636	8.629	9.481	9.809	7.704	6.288	7.753
I12	1.313	12.337	12.000	9.268	10.756	13.617	7.389	8.672	9.398	9.143	9.672	8.824	9.022	4.988	8.424
I60	1.421	6.361	6.031	8.840	7.716	11.200	5.268	6.915	7.014	3.639	5.787	4.834	5.318	4.023	7.308
SSR122	1.000	1.000	1.296	2.883	5.682	2.669	1.000	1.405	1.115	2.728	2.107	1.260	3.271	1.930	2.871
A86	1.041	2.025	1.738	4.261	4.741	3.807	2.164	3.191	2.234	2.390	1.100	1.888	1.889	1.586	1.585
D20	1.153	3.264	3.611	7.446	6.250	6.904	2.947	6.151	3.502	9.340	9.563	7.806	8.438	6.202	7.720
D88	3.230	6.849	6.261	10.691	10.331	11.228	5.068	8.288	5.643	5.042	6.146	8.455	4.661	2.899	5.018
J61	2.862	5.531	2.954	4.671	3.709	5.880	5.408	6.095	4.782	1.928	3.214	2.197	1.705	2.038	2.568
SSR82	1.151	5.493	6.545	5.121	7.310	7.459	4.681	5.762	5.766	4.363	5.143	4.071	4.595	3.837	4.606
SSR249	1.000	1.971	2.281	2.449	2.489	2.852	2.000	2.366	2.060	1.556	1.066	1.889	1.502	1.431	1.308
SSR109	1.946	1.117	1.087	2.511	1.986	2.146	1.000	1.229	1.046	2.461	3.322	2.495	2.900	1.863	3.133
SSR40	1.000	5.457	4.744	2.945	3.623	3.986	5.220	5.750	4.664	1.378	1.481	1.265	1.393	1.091	1.303
SSR93	3.631	8.225	5.486	5.066	5.014	5.627	8.477	4.378	7.627	3.586	6.522	4.996	5.309	4.360	6.877
Genepool	1.605	4.509	4.237	5.843	6.074	6.395	3.867	4.863	4.313	4.778	5.313	4.770	4.600	3.704	4.853

Tabelle 1: Effektive Anzahl der Allele an den Kermikrosatelliten als Maß für genetische Vielfalt

	Nord Sumatra	Ost Sumatra	West Java	Ost Java	Süd-Ost Kalimantan	Zentral Sulawesi	Süd-Ost Sulawesi 1	Süd-Ost Sulawesi 2	Philippinen	Palau	Nord-West PNG	Nord-Ost PNG 1	Nord-Ost PNG 2	Australien
Kambodscha	0.876 ***	0.874 ***	0.772 ***	0.852 ***	0.830 ***	0.889 ***	0.872 ***	0.875 ***	0.829 ***	0.826 ***	0.824 ***	0.803 ***	0.839 ***	0.834 ***
Nord Sumatra		0.235 ***	0.583 ***	0.572 ***	0.440 ***	0.260 ***	0.338 ***	0.260 ***	0.762 ***	0.766 ***	0.752 ***	0.774 ***	0.795 ***	0.798 ***
Ost Sumatra			0.550 ***	0.547 ***	0.454 ***	0.289 ***	0.336 ***	0.267 ***	0.743 ***	0.770 ***	0.762 ***	0.771 ***	0.804 ***	0.801 ***
West Java				0.305 ***	0.292 ***	0.627 ***	0.597 ***	0.616 ***	0.442 ***	0.507 ***	0.418 ***	0.457 ***	0.509 ***	0.458 ***
Ost Java					0.288 ***	0.597 ***	0.573 ***	0.595 ***	0.471 ***	0.521 ***	0.473 ***	0.512 ***	0.506 ***	0.471 ***
Süd-Ost Kalimantan						0.482 ***	0.462 ***	0.484 ***	0.485 ***	0.521 ***	0.460 ***	0.519 ***	0.547 ***	0.488 ***
Philippinen							0.319 ***	0.243 ***	0.792 ***	0.795 ***	0.785 ***	0.812 ***	0.830 ***	0.815 ***
Süd-Ost Sulawesi 1								0.229 ***	0.758 ***	0.741 ***	0.727 ***	0.754 ***	0.782 ***	0.744 ***
Süd-Ost Sulawesi 2									0.783 ***	0.776 ***	0.768 ***	0.795 ***	0.820 ***	0.793 ***
Zentral Sulawesi										0.421 ***	0.323 ***	0.297 ***	0.324 ***	0.309 ***
Palau											0.377 ***	0.390 ***	0.455 ***	0.356 ***
Nord-Ost PNG 1												0.269 ***	0.337 ***	0.274 ***
Nord-Ost PNG 2													0.327 ***	0.264 ***
Nord West PNG														0.312 ***

Tabelle 2: Genetischer Abstand nach Gregorius zwischen den *Intsia* Populationen. Signifikanzniveau: ns ; * p < 0.05 ; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

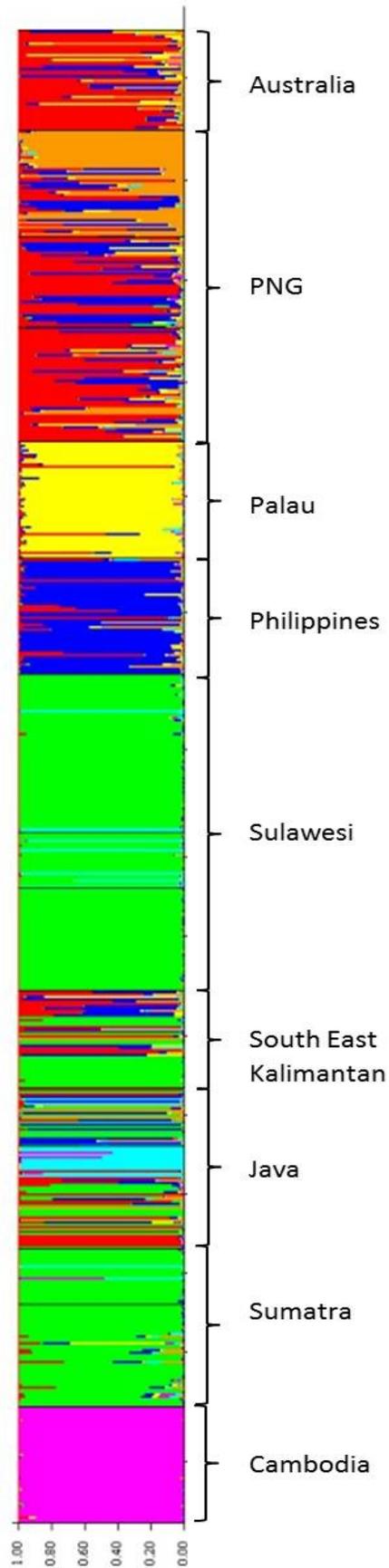


Abbildung 12: Clusteranalyse mit STRUCTURE, $K = 7$ Cluster. Die gleiche Farbe bedeutet Zugehörigkeit zum gleichen Genpool

Chloroplasten Marker

Die Suche nach Chloroplasten-Genmarkern mit einem deutlichen geographischen Muster war sehr erfolgreich. Sieben DNA-Fragmente aus dem Chloroplasten wurden für die genetischen Inventuren ausgewählt. Fünf Chloroplasten-Fragmente zeigten Unterschiede in grösseren Bereichen der Sequenz und zwei Fragmente enthalten drei und vier SNP Marker. Die Fragmentanalysen wurden mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt und die SNPs wurden mit Hilfe von PCR-RFLP und Sequenzierung detektiert. Mindestens 10 Individuen pro Population (416 insgesamt, aus 41 Populationen) wurden an allen sieben Fragmenten untersucht. Aus der Kombination der genetischen Variation der einzelnen Chloroplasten-Fragmente ermittelten wir insgesamt 36 verschiedene Haplotypen (Abb. 13). Einzelne dieser Haplotypen kamen in mehreren Populationen vor (H9, H20, H21 und H29) während andere auf kleinere Gebiete begrenzt waren (H6: Papua, H10: West PNG, H15: West PNG (Inland), H16: West Papua, H22: West Java, H24: Philippinen Palawan, H27: Palau, H34: Kambodscha, und H36: PNG).

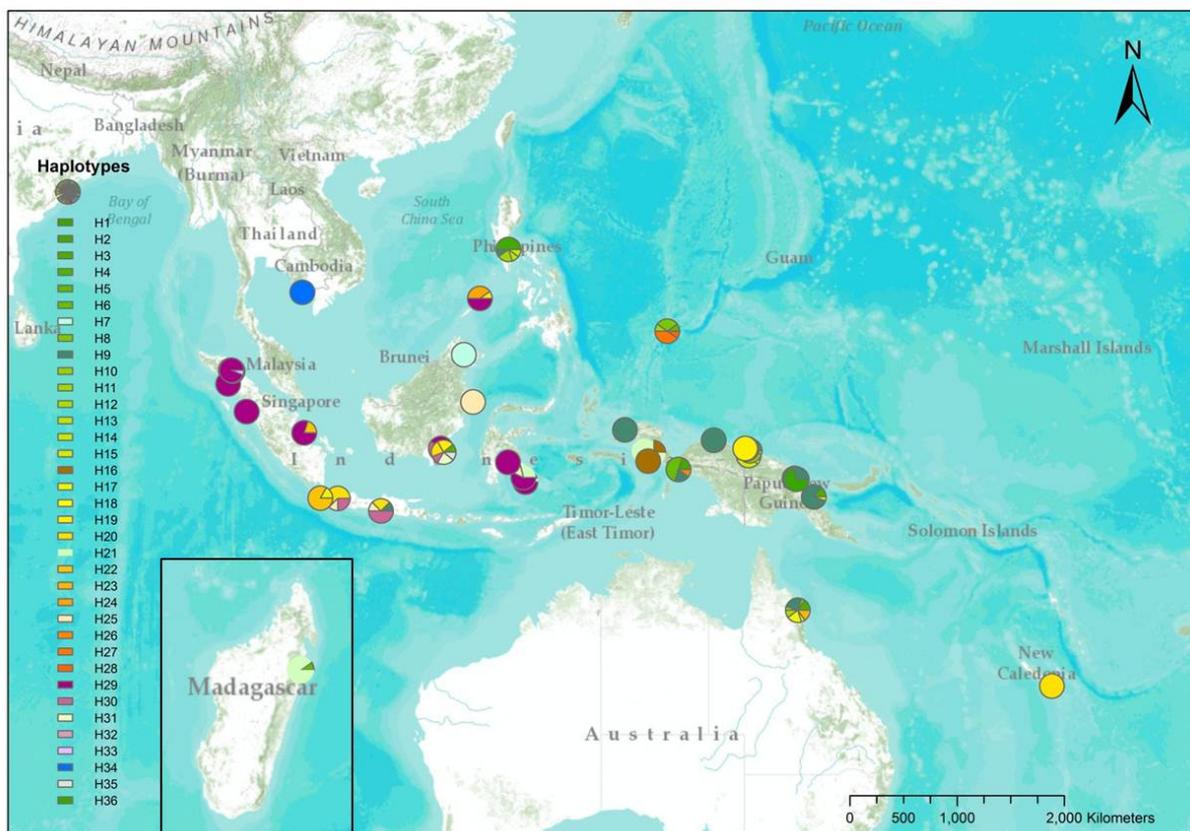


Abbildung 13: Verteilung der Chloroplasten-DNA Haplotypen

Die genetischen Abstände zwischen den Häufigkeiten der Haplotypen an den sieben Chloroplasten-Fragmenten nutzten wir für eine Clusteranalyse. Das damit errechnete Dendrogramm zeigt, ähnlich wie für die Daten der Mikrosatelliten, eine Ost- und eine West-Gruppe (Abb. 14). Die Populationen in Kambodscha waren klar von allen anderen abgegrenzt und die Populationen in Java und Kalimantan waren bei dieser Analyse eine deutlich abgegrenzte Untergruppe. Insgesamt ergab sich also eine gute Übereinstimmung der räumlichen Struktur der genetischen Daten von Chloroplasten und Kernmikrosatelliten.

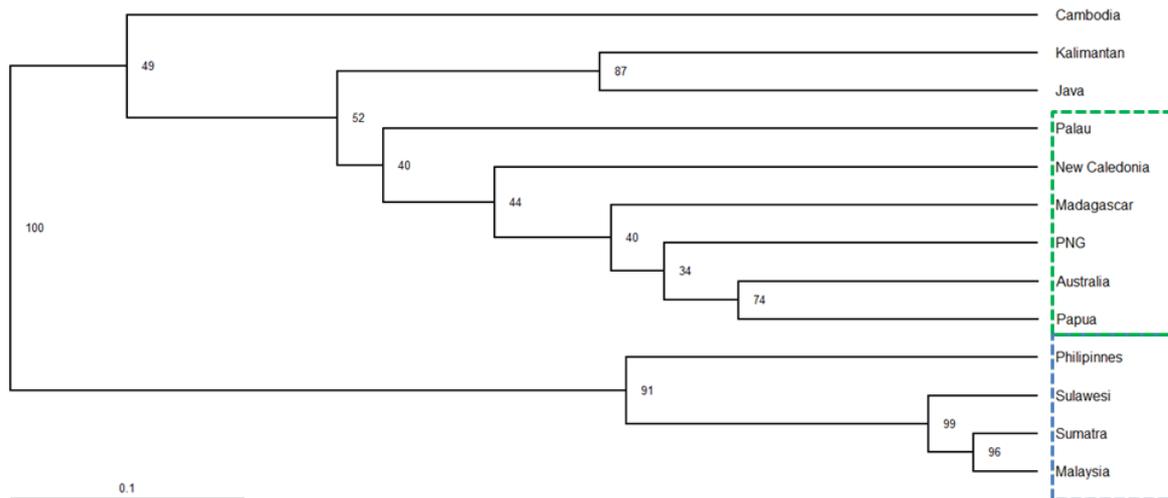


Abbildung 14: Genetische Unterschiede zwischen den verschiedenen *Intsia* Populationen bei den Chloroplasten Genmarkern, dargestellt als Dendrogramm einer UPGMA Clusteranalyse, berechnet aus den genetischen Abständen. Gut zu erkennen sind zwei Gruppen, eine West-Gruppe (lila) und eine Ost-Gruppe (grün).

„Single-Nucleotid-Polymorphism“ (SNPs)

Mit dem neuen Ansatz der RAD Sequenzierung gelang es schließlich 19 Kern-SNPs mit ausreichender Qualität zu gewinnen. Nach weiteren Tests mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung wählten wir hiervon für die genetischen Inventuren sechs SNPs aus. Mit diesen sechs SNPs des Zellkerns wurden dieselben 416 Individuen aus 41 Populationen analysiert, wie bei den Chloroplasten-Genmarkern. Die genetische Differenzierung zwischen den einzelnen Populationen war hierbei geringer als bei den Kern-Mikrosatelliten und den Chloroplasten-Genmarkern ($\Delta = 0.25$, $F_{ST} = 0.43$). Dies hatten wir für Genmarker mit zwei Allelen auch so erwartet. Der große Vorteil der SNPs lag jedoch darin, dass die räumliche Auflösung der genetischen Unterscheidbarkeit für die wichtige Region PNG und Papua ganz erheblich gesteigert werden konnte. So ließen sich die Populationen auf PNG und Papua mit den Chloroplasten-Genmarkern nicht trennen, während dies mit den SNPs fast vollständig möglich war (Abb. 15). Lediglich die grenznahen Populationen PNG 30 und PNG 31 wurden dem Papua-Cluster zugeordnet. Ein weiterer wichtiger Vorteil der SNPs ist die Kürze der untersuchten DNA-Sequenz. Je kürzer die DNA-Fragmente sind, umso besser lassen sie sich auch bei Holz mit zumeist stark degraderter DNA nachweisen.

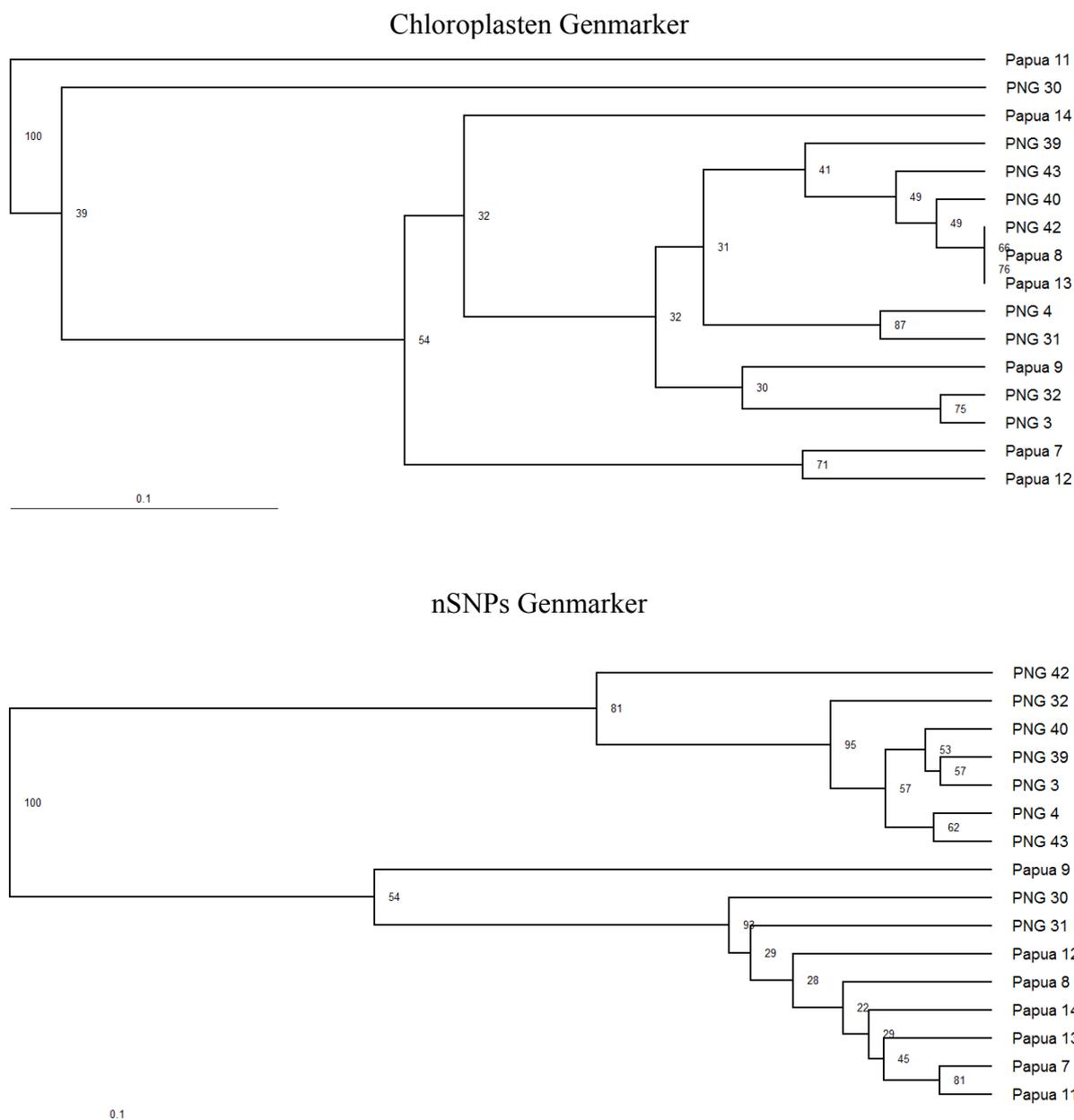


Abbildung 15: Oben Dendrogramm basierend auf den Chloroplasten Genmarkern für Populationen aus PNG und Papua; unten Dendrogramm basierend auf SNP-Genmarkern des Zellkerns

3.1.3 Eignung der Genmarker für die Kontrolle der Holzherkunft

Im Projekt wurden schließlich drei verschiedene Arten von Genmarkern eingesetzt: Kern-Mirosatelliten (nSSRs), Chloroplasten Genmarker (CP) und Einzelbasenvarianten im Zellkern (nSNPs). Die Eignung dieser Genmarker bzw. Kombinationen dieser Genmarker für die Kontrolle der Holzherkunft kann anhand der genetischen Differenzierung beurteilt werden. Je stärker die genetischen Unterschiede bei einem Satz von Genmarkern zwischen verschiedenen Kollektiven sind, umso besser ist die Eignung für Herkunftskontrollen. Die genetische Differenzierung berechneten wir anhand von drei verschiedenen Maßen (Δ , F_{st} und $F_{st}(\text{Hedrick})$). Die stärkste genetische Differenzierung fand sich bei den Multilocus-Haplotypen der Chloroplasten Genmarkern (CP ML in Tab. 3), gefolgt von den Kern-

Mikrosatelliten (nSSRs), den Einzellocus-Haplotypen der Chlorplasten (CP SL) und den Einzelbasenvarianten (nSNPs).

	nSSR	CP SL	CP ML	nSNP	CP SL & nSNP	CP ML & nSNP
Anzahl Individuen	670	416	416	416	416	416
Anzahl Genmarker	15	11	11	5	16	16
Populationen						
Anzahl Population	23	41	41	41	41	41
Delta (Gregorius)	0.48	0.29	0.84	0.25	0.28	0.35
F _{ST}	0.23	0.66	0.67	0.43	0.59	0.47
F _{ST} (Hedrick)	0.64	0.73	0.95	0.56	0.68	0.62
Erfolg Selbstzuordnung	62 %	27.4 %	29.1 %	15.6 %	43.8%	47.1 %
Regionen						
Anzahl Regionen	10	14	14	14	14	14
Delta (Gregorius)	0.48	0.29	0.86	0.22	0.27	0.32
F _{ST}	0.22	0.48	0.52	0.31	0.43	0.34
F _{ST} (Hedrick)	0.66	0.59	0.94	0.45	0.54	0.53
Erfolg Selbstzuordnung (%)	71 %	50 %	59 %	28 %	58 %	61 %
Erfolg Selbstzuordnung Gruppe N=3 (%)	90 %	69 %	84 %	46 %	92 %	92%

Tabelle 3: Genetische Differenzierung zwischen Populationen und Regionen gemessen mit den Maßen delta, Fst und Fst (Hedrick) sowie Erfolg der Selbstzuordnung einzelner Individuen für die verschiedenen Genmarker und Kombinationen von Genmarkern (nSSR = Kernmikrosatelliten, CP SL = Chloroplastenmarker nicht aggregiert, CP ML = Chloroplastenmarker aggregiert zu Multilocus-Haplotypen, nSNP = Kern-Single-Nucleotide Polymorphismen, CP SL & nSNP = Kombination von nicht aggregierten Chloroplasten und Kern-Single-Nucleotide Polymorphismen, CP ML & nSNP = Kombination von aggregierten Chloroplasten und Kern-Single-Nucleotide Polymorphismen)

Für die Zuordnung von Individuen zu Populationen bzw. Regionen benutzten wir das Programm GeneClass2. Als Maß für die Zuverlässigkeit der Zuordnung und damit der Herkunftskontrolle berechneten wir den Prozentsatz der richtigen Fälle bei einer Selbstzuordnung. Bei der Selbstzuordnung nimmt das Programm der Reihe nach jedes Individuum aus dem Referenzdatensatz heraus und berechnet anschließend, welchem Kollektiv dies statistisch zugeordnet würde. Die statistische Zuordnung der Individuen basiert auf den Häufigkeiten der Allele bzw. Haplotypen in den Kollektiven. Auf der Ebene der Population lagen diese Werte zwischen 16% (nSNPs) und 62% (nSSRs). Bei höherer Aggregation der Referenzdaten zu Regionen lagen diese Werte zwischen 28 % (nSNPs) und 71 % (nSSRs). Die Selbstzuordnung von Gruppen von drei Individuen war deutlich sicherer. Hier lagen die Werte der richtigen Zuordnung zwischen 46 % (nSNPs) und 92 % (CP + nSNP). Bei noch höherer Aggregation der Referenzdaten (z.B. alle Populationen der Ost-Gruppe und alle Populationen der West-Gruppe) war auch die Zuordnung einzelner Individuen für die Chloroplasten-Genmarker in über 93% der Fälle richtig. Das sinnvolle Niveau der Aggregation hängt von der zu testenden Deklaration der Holzherkunft ab.

Räumlich genetisches Muster der Referenzdaten

Mit Kernmikrosatelliten ließen sich einige Regionen (Kambodscha, Palau, Philippinen, Sumatra/Sulawesi) sehr gut unterscheiden. Leider konnten diese Marker für West Papua,

Madagaskar, Nord Kalimantan und den südlichen Philippinen wegen eines mehr als doppelten Chromosomensatzes nicht verwendet werden. Dadurch ist die Herkunftsidentifizierung aufgrund von Auswertungsschwierigkeiten mit diesen Markern nicht möglich.

Interessant war die starke genetische Ähnlichkeit zwischen Populationen in Sumatra und Sulawesi, und Madagaskar mit West Papua. Laut Information der Wissenschaftler in Madagaskar ist *Intsia* dort autochthon und unsere Proben wurden in einem Urwald-Relikt gesammelt. Wir hatten nicht erwartet, dass diese sehr weit voneinander entfernten Populationen eine so große Ähnlichkeit zeigen würden. Die einzige Erklärung ist ein jahrhundertalter Pflanzenimport. Wir haben sehr wenig Informationen über die Populationen in Sulawesi, auch dort ist ein früherer Import von Saatgut nicht auszuschließen.

Die bereits angesprochene klare Trennung zwischen Populationen aus Papua und PNG, wenn sowohl die Chloroplastenmarker als auch die nSNPs verwendet werden, zeigte sich auch sehr deutlich bei einer Auswertung mit STRUCTURE. Die Auswertung der Daten mit STRUCTURE lieferte hierbei insgesamt 10 verschiedene Cluster, die eine geographische Struktur zeigen (Abb. 16).

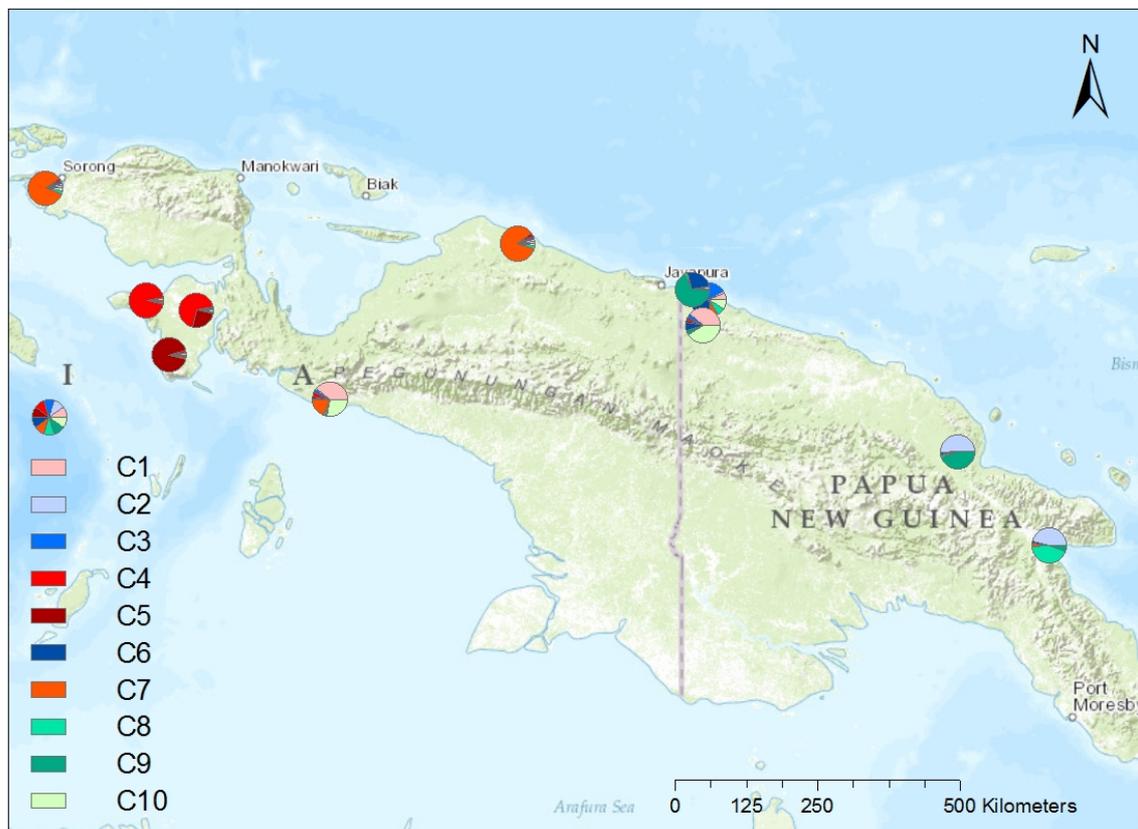


Abbildung 16: Räumliche Verteilung der Zuordnung von Chloroplasten und nSNP Genotypen zu 10 Clustern auf der Insel Papua.

Sowohl die Daten der Kernmikrosatelliten als auch die Daten der Chloroplastengenmarker gruppierten die Merbau-Populationen in eine Ost- und eine Westgruppe mit Java und Kalimantan als Mischzone. Diese genetische West-Ost Trennung folgt den sehr bekannten Wallace- und Weber-Linien (Abb.17). Diese Linien stellen die Grenze zwischen asiatischer und australischer Fauna dar. Während der Eiszeiten waren im Westen Malaysias, Sumatra, Java und Kalimantan (Sunda-Sockel), und im Osten Australien und Papua (Sahul-Sockel) durch das Festland verbunden. Zwischen Sulawesi und Papua befand sich ein sehr tiefes

Meer, das die Dispersion von Pflanzen verhinderte. Diese Isolation erklärt auch gut die genetische Differenzierung in eine West- und eine Ostgruppe bei Merbau.

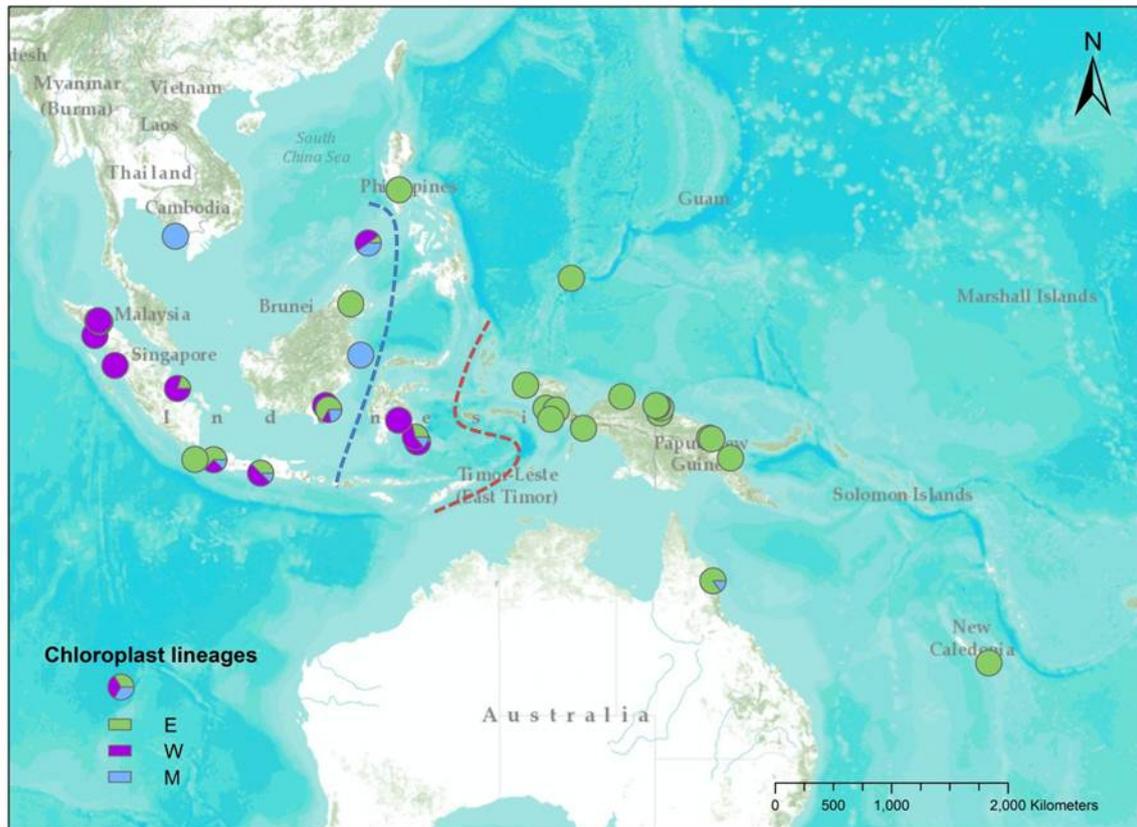


Abbildung 17: Verteilung der Chloroplasten-DNA Gruppen. In blau: Wallace Linie. In rot: Weber Linie.

3.1.4 Optimierung DNA Extraktion

Im Rahmen des Projektes wurde die DNA-Extraktion von Merbau-Holzproben optimiert. Insbesondere wurde großer Wert auf sauberes Arbeiten gelegt, da bei Holzproben deutlich empfindlichere Methoden angewandt werden müssen, als bei Blättern oder Kambium. Alle Arbeitsmaterialien wurden mit UV-Licht dekontaminiert oder mehrere Stunden bei 180 °C erhitzt. Zudem wurden die Arbeitsplätze vor der Arbeit immer mit Ethanol gereinigt. Von den Holzproben wurde vor der Probennahme eine äußere Schicht verworfen und anschließend feine Späne von der darunter liegenden Schicht gewonnen. Diese wurden in einer Schwingmühle (Firma: Retsch) zu feinem Pulver gemahlen. Für den fortlaufenden Prozess wurde die Zusammensetzung des Extraktions-Puffers darauf angepasst, Kohlenhydrate und Polyphenole besser abzutrennen. Ferner wurden die Reaktionszeiten für bestimmte Komponenten mit der Probe, z.B. die Inkubation der Probe im Extraktionspuffer, verlängert. Abschließend wurde die DNA-Lösung mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt, um die Qualität der DNA-Lösung weiter zu steigern. Zur Kontrolle der Erfolge bei der Optimierung wurden vier Merbau-Holzproben (M11, M12, M13 und M14) ausgewählt und jeweils zweimal nach herkömmlichen CTAB-Protokoll (an Versuchsbedingungen angepasst; CTAB1 und CTAB2) sowie einem optimierten Protokoll (mCTAB1 und mCTAB2) aufgeschlossen. Zur Kontrolle des Extraktionserfolgs wurde eine Amplifikation (Polymerasekettenreaktion) eines ausgewählten DNA-Abschnitts im Chloroplasten (MCcmp7) durchgeführt. Zur Auswertung wurden die amplifizierten Proben auf einem Agarosegel aufgetragen und die Intensität der spezifischen Bande als Vergleich verwendet (Abb. 18). Neben den Proben

wurde bei der Polymerasekettenreaktion eine Negativkontrolle (negativK) eingeführt, die anzeigt, dass die Amplifikation sauber durchgeführt wurde. Außerdem ist ein Längenstandard (Ladder) auf das Agarosegel aufgetragen worden, der mit einer definierten DNA-Kombination eine Bestimmung der Fragmentlänge erlaubt.

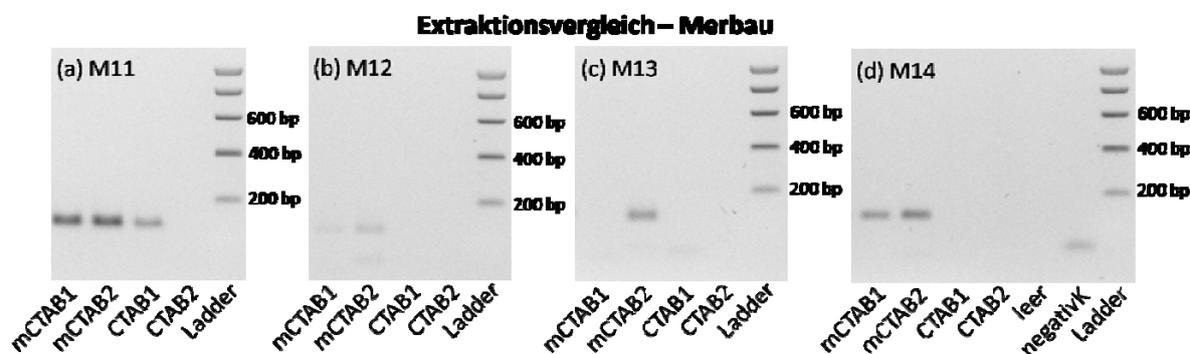


Abbildung 18: Extraktionsvergleich zur Kontrolle der Optimierung; dargestellt ist das Foto eines Agarosegels mit vier verschiedenen Merbauproben (M11, M12, M13, M14). Die Proben wurden jeweils zweimal nach einem herkömmlichen CTAB-Protokoll (CTAB) und einem optimierten CTAB-Protokoll (mCTAB) extrahiert. Anschließend wurde ein Genmarker (MCcmp7) amplifiziert und die Amplifikate im Agarosegel aufgetrennt.

Deutlich erkennbar ist, dass bei jeder der getesteten Proben wenigstens eine der zwei Extraktionen, nach optimiertem Protokoll, erfolgreich war. Im Vergleich dazu konnte mit dem herkömmlichen Protokoll ausschließlich bei einer Probe (M11) erfolgreich DNA extrahiert werden. Damit wurde eindeutig nachgewiesen, dass durch die Optimierung der DNA-Extraktion der Erfolg bei Holzproben deutlich gesteigert werden konnte.

3.1.5 Praxis Test

Die Firma *Plant Genetic Diagnostics GmbH* hatte als Projektpartner die Aufgabe, die in diesem Projekt entwickelten Verfahren auf ihre Praxistauglichkeit zu überprüfen. Insgesamt wurden hierbei 201 Holzproben mit den Chloroplasten-Genmarkern auf ihre geographische Herkunft getestet. Die Kernmikrosatelliten wurden wegen der Variation im Polyploidiegrad nicht für den Praxistest genutzt. Die genetischen Inventuren der nSNPs am Referenzmaterial waren zu Beginn des Praxistest noch nicht abgeschlossen, so dass auch diese hier keine Anwendung fanden.

Die Firma HARO (Hamberger Flooring GmbH & Co. KG, Rohrdorfer Straße 133, 83071 Stephanskirchen) hatte zugesagt, bei diesem Praxistest mitzumachen und entsprechende Holzmuster zu liefern. Dieser Betrieb ist Marktführer im Bereich Parkett in Deutschland und führt auch Merbau im Sortiment. Das Holz wird von der Firma in Form von Schnittware aus Asien importiert und dann in Deutschland weiterverarbeitet.

Die Firma DHTT war der zweite Projektpartner des Praxistests, der Merbau-Holzproben aus verschiedenen Forstkonzessionen und Sägewerken in Asien und aus dem Handel in Australien lieferte.

Material

Firma HARO sandte *Plant Genetic Diagnostics GmbH* drei Chargen von Rohholzproben der Gattung Merbau (*Intsia* ssp.) zu. Die Lieferungen bestanden aus jeweils 25 Mustern, die zu 4 bzw. 30 mm starkem Schnittholz verarbeitet waren. Die Firma DHTT lieferte verarbeitete Holzproben (Massivholzprodukte aus Möbel- und Parketherstellung, 26 Proben), die in

Australien im Handel waren, sowie Rohholzproben aus verschiedenen Sägewerken und Forstkonzessionen Indonesiens (100 Proben).

Methoden

DNA-Aufreinigung

Die Extraktion intakter Erbsubstanz aus Holzgewebe war insbesondere hinsichtlich des Zeitbedarfs wesentlich aufwendiger als aus frischen Pflanzengewebe (Blatt, Knospe, Wurzel etc.). In einem ersten Schritt wurden zunächst von jeder Holzprobe unter Berücksichtigung besonderer Reinhaltung Holzspäne abgehobelt (Schnitzgerät mit UV-dekontaminierten Messereinsätzen) und bei -20°C in 2 ml Reaktionsgefäßen bis zum nächsten Verarbeitungsschritt gelagert. In einem zweiten Schritt wurden diese Proben in flüssigem Stickstoff noch weiter abgekühlt, zwei Stahlkugeln hinzugefügt und anschließend in einer Retschmühle (Modell MM 300) zu einem feinen Pulver zermahlen. Es folgte eine fünfstündige Lysis (Auflösung der Zellwandbestandteile) sowie eine modifizierte Aufreinigung der DNA.

PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die analysierten DNA-Fragmente befinden sich alle im Chloroplasten-Genom (cpDNA) und haben eine Länge von 113 bis 217 Basenpaaren. Für die PCR-Amplifikation verwendeten wir im Gegensatz zu den genetischen Inventuren am frischen Referenzmaterial die hochwertige Polymerase AmpliTaqGold von Applied Biosystems. Im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Programmen mit 30 bis 35 Amplifikationszyklen haben wir jeweils 45 Zyklen gefahren. Beide Modifikationen des Versuchsprotokolls waren notwendig, um trotz geringer Konzentration und degradierter DNA im Holz noch Ergebnisse zu erzielen.

Auftrennung nach Fragmentlängen sowie SNP-Detektion

Die geographischen Unterschiede der Chloroplastenmarker beruhen zum einen auf Insertionen/Deletionen, die sich demzufolge in Fragmentlängenunterschieden bemerkbar machen. Zum anderen gibt es Fragmente, die sich nur an einzelnen Nukleotiden unterscheiden (sogenannte 'Single Nucleotide Polymorphisms' = SNPs).

Die Kapillarelektrophorese zur Bestimmung der Fragmentlängenpolymorphismen wurde auf einem *ABI 3730* mit 48 Kapillaren der Firma *Life Technologies* durchgeführt. Einzelnukleotidunterschiede wurden mit Hilfe des PCR-RFLP-Ansatzes (PCR-Produkt + Restriktionsenzym) und anschließender Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen. Eine direkte Sequenzierung so wie beim frischen Referenzmaterial erwies sich aufgrund der teilweise schwachen Amplifikation als schwierig, so dass im Verlauf des Praxistests ein weiteres Verfahren entwickelt und eingesetzt wurde. In diesem sogenannten SNaPshot-Verfahren werden die PCR-Produkte direkt in einem Multiplex-Ansatz auf dem o.g. Kapillarsequenzierer analysiert. Diese Methode erlaubt auch die Analyse von Proben mit sehr geringer DNA-Konzentration (Vallone et al. 2004).

Ergebnisse und Diskussion

Ausbeute an genetischen Daten aus Holz über 30%

Die Erzeugung reproduzierbarer genetischer Daten aus Holz ist weitaus schwieriger als aus frischem Pflanzenmaterial (Blätter, Knospen, Kambium) oder auch aus herbartgetrockneten Blättern. Hier liegen die Erfahrungswerte bei ca. 90 bis 95%, an Holz wurde dies noch nie im Rahmen größerer Untersuchungen getestet.

In den Abbildungen 19 sind die prozentualen Anteile an auswertbaren Daten für alle untersuchten cpDNA-Fragmente dargestellt. Es wird deutlich, dass die hier eingesetzten Marker ein sehr unterschiedliches Bild ergaben. Die Erfolgsquote für eine eindeutige

Auswertung lag zwischen 15,7% (cp7-2) und 51,7%. Im Durchschnitt konnten für die Marker cp1 bis cp6 35% der Daten ausgewertet werden. Der Marker cp7 mit vier SNPs stellte das vielversprechendste diagnostische Merkmal mit hoher Aussagekraft dar. Hier lag die Ausbeute bei 48,6%. Dieser Wert ist aber zunächst nur als vorläufig zu bewerten, da die hier verwendete neue SNaPShot-Methode erst bei 26 Proben (von DHTT) eingesetzt werden konnte. Es ist allerdings anzumerken, dass nicht unbedingt alle cpDNA-Fragmente benötigt werden, um den jeweiligen Haplotypen zu bestimmen. Es reichen in vielen Fällen vier Marker mit hohem Informationsgehalt für eine Herkunftsbestimmung aus. Auch wenn über 30% der Holzproben keine auswertbaren Ergebnisse lieferten und in ca. 30% der Fälle nur ein bis drei cpDNA-Marker funktionierten, waren in über 1/3 der Proben vier bis sieben cpDNA-Fragmente für eine geographische Lokalisierung der Holzherkünfte verwertbar.

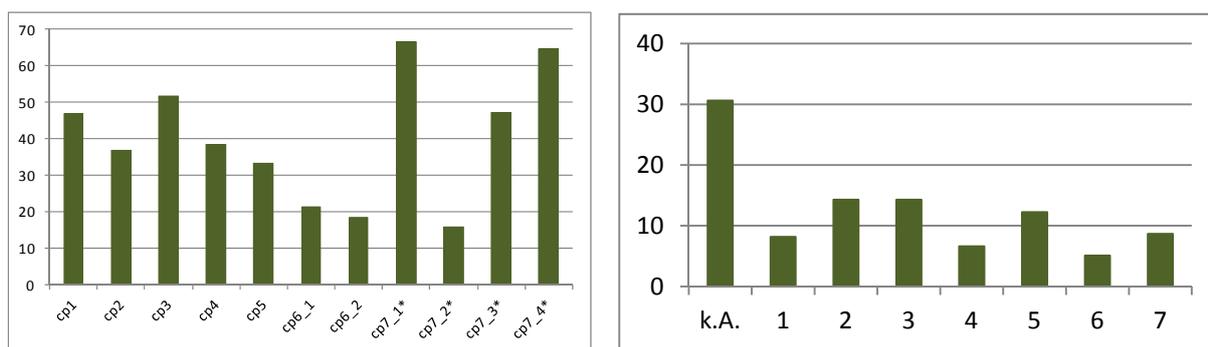


Abbildung 19: [a] Prozentualer Anteil auswertbarer Ergebnissen an den verschiedenen cpDNA-Markern (*nur an 26 Proben ausgetestet); [b] prozentualer Anteil Proben, die keine (k.A.) bzw. an 1 bis 7 cpDNA-Fragmenten auswertbare Ergebnisse lieferten

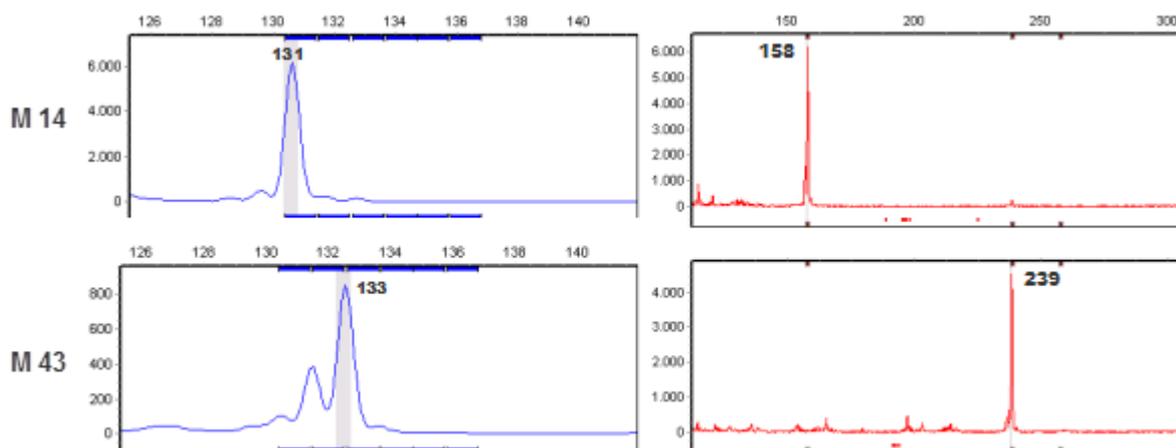


Abbildung 20: Fragmentlängen-Peaks aus der Kapillarelektrophorese (ABI 3730) für den cpDNA-Genort cp1 (blau) und cp5 (rot) aus den ersten beiden Holzmuster-Chargen der Firma HARO; oben: Holzmuster M14 aus der ersten Charge (gefundene Fragmentlängen von jeweils 131 bzw. 158 Basenpaaren), unten: Holzmuster M43 aus der zweiten Charge (Fragmentlängen 133 bzw. 239 Basenpaare)

Bestimmung von cp-Haplotypen und Aussagen zur geographischen Herkunft

Firma HARO: In Abbildung 20 sind Ergebnisse der Kapillarelektrophorese für die cpDNA-Loci cp1 und cp5 aus Proben der Firma HARO dargestellt. Die oberen beiden Fenster zeigen die Peaks mit Fragmentlängen von 131 und 158 Basenpaaren, wie sie für die Holzmuster 1 bis

25 beobachtet werden konnten. Die unteren beiden Fenster zeigen die entsprechenden Fragmentlängen für die Holzmuster 26 bis 50 (133 bzw. 239 bp.).

In Tabelle 4 sind die über alle cpDNA-Genorte ermittelten Chloroplasten-Haplotypen aufgeführt. Es wird deutlich, dass beide Lieferungen aus jeweils geographisch begrenzten Gebieten, evtl. sogar von den gleichen Bäumen abstammen können, denn es waren keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Holzmustern einer Liefercharge zu erkennen. Für die 1. Charge ist in zwei Fällen eindeutig der Haplotyp H29 detektiert worden, auch in den anderen Holzmustern kann dieser Haplotyp als der wahrscheinlichste angesehen werden. Die zweite Charge bestand aus den potentiellen Haplotypen H8 sowie H9.

Folgende Schlüsse über die geographische Herkunft der beiden Lieferungen von HARO können gezogen werden:

- Lieferung 1 (dicke Holzmuster): Der Haplotyp 29 kommt im westlichen Teil des Verbreitungsgebietes von Merbau vor, so dass die wahrscheinlichsten Herkünfte auf Sumatra, Malaysia, Sulawesi, Süd-Kalimantan aber auch auf den Philippinen zu suchen sind. Vollständig auszuschließen sind die Regionen Papua Neu Guinea und West Papua, die Palau-Inseln, Kambodscha sowie Australien und Madagaskar, im Wesentlichen also der östliche Teil des Verbreitungsgebietes.
- Lieferung 2 (dünne Holzmuster): Die hier vorgefundenen potentiellen Haplotypen kommen hauptsächlich in Papua und Papua Neu Guinea, Australien, Palau und den Philippinen vor. Auszuschließen sind geographische Herkünfte wie Sumatra, Malaysia, Kambodscha, Madagaskar und Sulawesi, im Wesentlichen also der westliche Teil des Verbreitungsgebietes.

Damit ergaben die Gentests keinen Grund, die Deklarationen zur Holzherkunft als falsch einzustufen. Die erste Holzcharge sollte aus Malaysia, also dem westlichen Teil des Verbreitungsgebietes stammen, die zweite Charge aus Papua (Indonesien), also dem östlichen Teil des Verbreitungsgebietes stammen.

Etwas schwächer, aber dennoch ziemlich eindeutig, fielen die Ergebnisse für die dritte Charge der Firma HARO aus (Tab. 5). Hier lag offensichtlich ebenfalls Holz des gleichen Baumstammes oder weniger, räumlich stark aggregierter Bäume vor, da keine Unterschiede in den Haplotypenkombinationen der verschiedenen Proben festgestellt werden konnten. Als wahrscheinlichster Haplotyp konnte der cp-Haplotyp Nr. 9 identifiziert werden, welcher auch sehr gut zur deklarierten Herkunft passt. Von der Firma HARO wurde Papua Barat (Indonesien) als Herkunftsregion genannt. Haplotyp Nr. 9 wurde in den Referenzdaten auch nur bei Individuen im westlichen Papua detektiert.

DHTT (Double Helix Tracking Technologies): Die Proben des Kooperationspartners in Singapur waren anders strukturiert. Es wurden keine Proben aus wenigen größeren Lieferchargen gezogen, sondern jeweils nur eine oder wenige Proben aus einer Vielzahl verschiedener Sägewerke bzw. Holzhandelsunternehmen Indonesiens und Australiens. In Tabelle 6 sind einige der vielen Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich, dass teilweise drei bis vier cpDNA-Genorte ausreichten, um eine relativ hohe Aussagekraft des DNA-Tests zu erzielen (siehe Holzprodukte der Firma CO aus Victoria bzw. Bu und M aus Perth, Australien). Hier konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit die Übereinstimmung mit der Herkunftsdeklaration des Unternehmens gefunden werden (Score > 99%). In anderen Fällen zeigten sich auch klare Diskrepanzen zwischen Herkunftsdeklaration und den Ergebnissen des cpDNA-Tests. Dies wurde insbesondere dann deutlich, wenn die Region des tatsächlichen

Holzeinschlags und die Herkunftsangabe deutliche Entfernungen aufwiesen (östliches und westliches Verbreitungsgebiet der Baumart, siehe Unternehmen S und TF).

Probe	cp1	cp2	cp3	cp4	cp5	cp6_1	cp6_2	cpDNA Haplotypen
M1	131		113	198	158			29, 30, 32, 33
M2	131		113	198				29, 30, 32, 33
M3	131		113		158			29, 30, 32, 33
M4						+		
M5	131		113	198				29, 30, 32, 33
M6	X	X	X	X	X	X	X	
M7	X	X	X	X	X	X	X	
M8	131	147		198	158			29, 30
M9	X	X	X	X	X	X	X	
M10	131		113	198		+		29, 30, 32, 33
M11	131	147	113	198	158	+	0	29
M12	131		113					29, 30, 32, 33
M13	X	X	X	X	X	X	X	
M14	131		113		158	+		29, 30, 32, 33
M15	131	147	113	198				29, 30
M16						+		
M17	X	X	X	X	X	X	X	
M18						+		
M19	X	X	X	X	X	X	X	
M20	131	147		198	158	+		29, 30
M21	X	X	X	X	X	X	X	
M22	X	X	X	X	X	X	X	
M23	X	X	X	X	X	X	X	
M24	131	147	113	198	158			29, 30
M25	131	147	113	198	158	+	0	29
	131	147	113	198	158	+	0	29

Probe	cp1	cp2	cp3	cp4	cp5	cp6_1	cp6_2	cpDNA Haplotypen
M26		133	113	199				
M27	X	X	X	X	X	X	X	
M28	X	X	X	X	X	X	X	
M29	X	X	X	X	X	X	X	
M30		133	113					
M31	133	133	113	199		+		
M32	X	X	X	X	X	X	X	
M33		133	113					
M34	X	X	X	X	X	X	X	
M35	133		113	199		+	+	
M36	133		113	199	239			
M37	X	X	X	X	X	X	X	
M38	X	X	X	X	X	X	X	
M39	X	X	X	X	X	X	X	
M40	133	133	113	199		+	+	
M41	133		113	199				
M42	133		113	199	239	+	+	4, 6, 7, 8, 9
M43	133		113	199	239	+	+	4, 6, 7, 8, 9
M44	X	X	X	X	X	X	X	
M45	X	X	X	X	X	X	X	
M46			113					
M47			113	199		+		
M48	133		113			+		
M49	133	133	113	199	239			4, 6, 7, 8, 9
M50	133		113		239			
	133	133	113	199	239	+		8, 9

Tabelle 4: Gefundene Chloroplasten-Haplotypen an Holzmustern aus zwei Merbau-Lieferungen der Fa. HARO (Charge 1: Holzmuster M1 bis M25; Charge 2: M26 bis M50) an den cpDNA-Loci cp1 bis cp5 (Fragmentlängendetektion) sowie cp6 (SNP-Detektion mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EaeI* und *MboI*, wobei + für geschnitten und 0 für ungeschnitten stehen); X = verworfenes Ergebnis aufgrund unklarer Ergebnislage (schlechte Amplifikation, störende Nebenprodukte aus der PCR)

Probe	cp1	cp2	cp3	cp4	cp5	cp6_1	cp6_2	cp7_1	cp7_2	cp7_3	cp7_4	cpDNA Haplotypen	
M51	133	134						T			G	7, 9, 10, 36	
M52	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
M53								T			G		
M54								T		C	G		
M55	133							T		C			
M56	133	134											
M57								T		C	G		
M58	133												
M59	133	134											
M60	133	134						T		C	G	7, 9, 10, 36	
M61										C			
M62	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
M63	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
M64								+	T		G		
M65								T			G		
M66								T	T	C	G		
M67	133		113					+	T				
M68	133		113					+	T				
M69	133				239			+	T				
M70	133				239			+	T				
M71	133				239			+	T				
M72									T		G		
M73	133	134			239			+	T	C	G	7, 9	
M74									T		G		
M75	133	134							T	C	G		
	133	134	113		239			+	T	T	C	G	9

Tabelle 5: Gefundene Chloroplasten-Haplotypen an Holzmustern aus einer Merbau-Lieferung der Fa. HARO (Charge 3: Holzmuster M51 bis M75) an den cpDNA-Loci cp1 bis cp5 (Fragmentlängendetektion) sowie cp6 und cp7 (SNP-Detektion mit Hilfe der SNaPshot-Methode); X = verworfenes Ergebnis aufgrund unklarer Ergebnislage (schlechte Amplifikation, störende Nebenprodukte aus der PCR); grau hinterlegt = der wahrscheinlichste Haplotyp der Charge

Unternehmen (verschlüsselt)	Unternehmens- standort (Stadt)	Herkunftsdeklaration Unternehmen	Ergebnis DNA-Test	Anzahl Genorte	Statistischer Score
Bu	Perth	Ost, SGS 0038 Mamberambo Concession West Papua	Ost: Central Papua	4	99,761
CTH	Perth	Ost	Ost: Central Papua	4	81,693
M	Perth	Ost	Ost: Central Papua	4	99,537
S	QSD	West, TFT Kalimantan	Ost: West Papua, Palau Muna, Madagaskar	9	99,986
H	NSW	Ost, ITI - Hock Aik West Papua	Ost: PNG, West-Papua	6	100
M10	NSW	Ost	Ost: West-Papua	5	99,999
S	NSW	West, TFT Kalimantan	Ost: West Papua, Palau Muna, Madagaskar	5	99,913
M10	Victoria	Ost	Ost	5	99,999
Bu	Victoria	Ost, SGS 0038 Mamberambo Concession West Papua	Ost: West-Papua	5	99,999
CO	Victoria	Ost	Ost	3	99,926
EW	Victoria	Ost	Ost	2	84,077
S	Victoria	West, TFT Kalimantan	West: größeres Gebiet incl. Kalimantan	5	65,425
WT	Sydney	Ost, Simmonds	West:	2	67,871
WT	Sydney	Ost, Simmonds	Ost: West Papua	7	99,992
A		Ost, Simmonds	West	4	53,568
EBM		Ost, Simmonds	Ost	3	85,179
EBM		Ost, Simmonds	Ost	4	83,561
Gw		Ost, Mamberambo concession West Papua (no SGS CoC)	West	4	53,568
TF	Adelaide	West, Could be Malaysian?	Ost	7	99,598
Bu	Adelaide	Ost, SGS 0038 Mamberambo Concession West Papua	Ost: Central Papua	4	99,761
S	Adelaide	West, TFT Kalimantan	West: größeres Gebiet incl. Kalimantan	8	100

	wenige genetische Daten (zu geringe statistische Aussagekraft)
	DNA-Test stützt Herkunftsdeklaration des Unternehmens
	DNA-Test widerspricht Herkunftsdeklaration des Unternehmens

Tabelle 6: Unternehmen und Unternehmensstandorte, an denen Merbau-Holzproben gezogen wurden; die Herkunftsdeklaration des Unternehmens sowie das Ergebnis des DNA-Tests, die Anzahl der auswertbaren cpDNA-Genorte sowie ein statistischer Score über die Zuverlässigkeit der genetischen Aussage

Fazit

Im Gegensatz zu den meisten anderen Verfahren (Papierdokumente, elektronische Label etc.) stellt diese Chloroplasten-DNA-Fingerprintmethode einen fälschungssicheren Ansatz dar, die geographische Herkunft von Merbau-Holz nachzuweisen. Insbesondere war es möglich, bestimmte Regionen klar ausschließen zu können. Darüber hinaus war eine Verfälschung der Ergebnisse durch DNA-Kontamination durch Eindringen von Pilzen (Fäulnisprozessen etc.) ebenfalls ausgeschlossen, da diese keine Chloroplasten besitzen.

Für die zukünftige Verwendung von genetischen Methoden in der Praxis und für eine optimale Datenausbeute können in Bezug auf die hier gewonnenen Erkenntnisse folgende Empfehlungen abgegeben werden:

- Es sollten immer mehrere Proben pro Lieferung oder pro Holzmuster analysiert werden, da nicht immer alle PCR-Amplifikationen an Holz sofort funktionieren.
- Auf reine Sequenzierreaktionen von PCR-Produkten aus Holzgewebe sollte gänzlich verzichtet werden, da hier wahrscheinlich generell mit Problemen gerechnet werden kann. Für die SNP-Detektion ist daher das SNaPShot-Verfahren zu empfehlen. Hier sind die analysierten DNA-Fragmente sehr kurz.
- Bei Fragmentlängenbestimmungen mittels Kapillarelektrophorese ist die parallele Analyse von Vergleichsproben aus archiviertem Material sinnvoll, da sich eventuell Shifts von einem Basenpaar Länge einschleichen können, je nachdem welche DNA-Polymerase (InvitrogenTaq, AmpliTaqGold etc.) verwendet wird.
- Es ist wichtig, dass für den Gentest immer ein klar definierter Prüfauftrag zur Herkunft des Holzes vorliegt. Es wird beim Gentest also versucht, aus dem Vergleich mit Referenzdaten eine vorliegende Deklaration zur Holzherkunft zu widerlegen. Gelingt dies nicht, dann muss die „Unschuldsvermutung“ gelten. Das heißt, die Angaben der Holzhändler werden als korrekt angesehen. Je besser die Referenzdaten sind, umso mehr Fehldeklarationen können entdeckt werden. Jedoch wird durch diese Herangehensweise ausgeschlossen, dass eine richtige Deklaration des Holzhändlers irrtümlich durch den Gentest als falsch eingestuft wird.

3.1.6 Datenbank

Am Thünen-Institut wurde eine PostgreSQL Datenbank für die Referenzdaten erstellt. Die PostgreSQL Plattform ermöglichte hierbei im Vergleich zu Microsoft Access mehr Flexibilität, höhere Sicherheit und den gleichzeitigen Zugriff mehrerer Nutzer. Für Microsoft Access wurde von der Datenbank eine ODBV-Verbindung zur Datenvisualisierung hergestellt. Neben den genetischen Daten enthält die Datenbank Informationen zu den beprobten Populationen zur geographischen Position und zur Baumart der Individuen. Die Datenbank läuft problemlos intern auf dem Server des Thünen-Instituts. Sie wurde bereits von mehreren Benutzern verwendet und ausgiebig getestet. Die Datenbank bei Bioversity International, in die diese Daten eingespielt werden sollten, war zum Zeitpunkt der Berichterstellung noch nicht fertig.

3.1.7 Internationale Netzwerkbildung

Schon die Durchführung des Projekts war das Ergebnis eines internationalen Netzwerkes. So kooperierten im Projekt in Deutschland die Universität Hamburg mit dem Thünen-Institut für Forstgenetik und der Firma Plant Genetic Diagnostics GmbH. Der wichtigste ausländische

Partner war Double Helix Tracking Technology mit Sitz in Singapur. Zur Verbesserung der DNA Extraktion hatte der Thünen-Wissenschaftler Lasse Schindler einen zweiwöchigen Aufenthalt im Labor von Prof. Andrew Lowe an der Universität Adelaide in Australien. Bei der Stichprobennahme halfen neben dem französischen Forschungsinstitut CIRAD in Neukaledonien und verschiedenen Forstkonzessionen in Indonesien und Papua Neu Guinea, das Tropische Herbarium in Australien, SNGF (Silo National des Graines Forestières) in Madagaskar, und der Biologe Ben Hayes aus Edinburgh (UK). Während des Projekts führten wir zwei interne Workshops zur Koordinierung der Arbeiten durch. Ein Workshop fand am 02.11.2010 in Großhansdorf am Thünen-Institut für Forstgenetik und ein zweiter am 14.02.2012 in Singapur statt. Zum Abschluss des Projekts präsentierten wir die Ergebnisse und die Anwendungsmöglichkeiten am 14.12.2013 auf einem Workshop in Singapur Vertretern von wichtigen Holzverarbeitenden Betrieben in Asien.

Das Projekt und die Ergebnisse wurden auf mehreren internationalen Veranstaltungen vorgestellt:

- IUFRO World Congress, Seoul, Korea, August 2010
- CIRAD Montpellier, Frankreich, Juli 2010
- ITTO Workshop, Hamburg, Deutschland, März 2011
- ITTO Workshop, Yaoundé, Kamerun, März 2011
- Conference on Forensic Inference and Statistics, Seattle, USA, Juli 2011
- FRIM, Kuala Lumpur, Malaysia, Februar 2012
- ITTO Treffen, Kumasi, Ghana, April, 2012
- IUFRO FORNESSA Regional Congress, Nairobi, Kenia, Juni 2012
- ITTO Workshop DNA tracking, Nairobi, Kenia, März 2013
- Eröffnungsveranstaltung des Thünen-Kompetenzzentrum Holzherkünfte, Hamburg, März 2013

Die Projektbearbeiter haben sich aktiv an den Arbeiten des bei Bioversity International in Kuala Lumpur angesiedelten „Global Timber Tracking Networks“ beteiligt. So unterstützte Herr Degen die Erstellung der Datenbank des Netzwerkes mit seiner Teilnahme an zwei Workshops hierzu bei Bioversity International in Rom, er ist Mitglied der Steuerungsgruppe und nahm an den regionalen Workshops des Netzwerkes in Malaysia und Brasilien teil.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Am Anfang des Berichts hatten wir das Ausmaß des illegalen Holzeinschlages und des Handels mit diesem Holz für Merbau dargestellt. Der jährliche Gesamtholzeinschlag von Merbau dürfte in einer Größenordnung von 1.500.000 bis 2.500.000 m³ Holz liegen. Brennpunkte des illegalen Holzeinschlages sind hierbei die indonesische Provinz Papua, der Staat Papua Neu Guinea und die malaysischen Provinzen Sabah und Sarawak. China nimmt als Hauptimporteur, Holzverarbeiter und Exporteur verarbeiteter Holzprodukte eine Schlüsselstellung ein. Nach Europa werden jährlich ca. 50.000 m³ Merbau Holz geliefert.

Die großen Nachfrager von Holzprodukten, zu denen viele europäische Länder und speziell auch Deutschland gehören, haben bei der Eindämmung des illegalen Holzeinschlages eine besondere Verantwortung. Die Europäische Union hat im Jahr 2003 einen FLEGT-

Aktionsplan beschlossen (FLEGT = Forest Law Enforcement, Governance and Trade). Ein wichtiges Element sind hierbei freiwillige Partnerschaftsabkommen („Voluntary Partnership Agreements“, VPA) mit Holzlieferländern zur Einführung eines Legalitätsnachweises für Holzimporte in die EU. Indonesien und Malaysia mit großem Vorkommen an Merbau haben mit der EU solche VPAs unterzeichnet bzw. sind dabei, diesen Prozess abzuschließen. Zudem wurde als wirksame Ergänzung auf EU-Ebene die Holzhandels-Verordnung erlassen. Diese Verordnung ist seit März 2013 vollständig wirksam. Sie verbietet die Vermarktung von illegal eingeschlagenem Holz und verpflichtet alle Marktteilnehmer, die innerhalb der EU Holz oder Holzprodukte erstmalig in Verkehr bringen, bestimmte Sorgfaltspflichten einzuhalten. Dazu gehört auch die Informationspflicht zur Art und Herkunft des Holzes. Zur Umsetzung dieser EU-Verordnung in deutsches Recht ist das Holzhandels-Sicherungs-Gesetz (HolzSiG) verabschiedet worden. Auch die USA haben mit dem Lacey-Act rechtliche Vorschriften zur Verhinderung der Einfuhr von illegal eingeschlagenem Holz eingeführt.

Es sind jedoch effektive Methoden zur Kontrolle der genannten rechtlichen Rahmenbedingungen erforderlich, um den illegalen Holzeinschlag merklich zu reduzieren. Konkret sind Kontrollinstrumente auf verschiedenen Ebenen sinnvoll:

- a) Überprüfung der Baumart
- b) Überprüfung des Herkunftslandes
- c) Überprüfung der Region innerhalb eines Landes (z.B. Forstkonzession)
- d) Rückverfolgung einzelner besonders wertvoller eingeschlagener Bäume

Die Ergebnisse des Projekts können in der Praxis zum einen von Marktteilnehmern (Holzimporteuren) genutzt werden, um mit Hilfe genetischer Tests ihrer in der EU-Holzhandelsverordnung verlangten „Sorgfaltspflicht“ nachzukommen. So können Holzimporteure mit Hilfe von genetischen Untersuchungen überprüfen, ob die Angaben ihrer Zulieferer zu Ursprungsland und Ursprungsregion des Holzes glaubwürdig sind. Zum anderen können staatliche Kontrolleinrichtungen die Gentests bei Merbau nutzen, um die Angaben von Marktteilnehmern zum geographischen Ursprung des Holzes auf seine Richtigkeit zu überprüfen. Schließlich können die entwickelten Methoden von Zertifizierungssystemen genutzt werden, um Merbau-Holz aus genetisch überprüften legalen Quellen auf den Markt zu bringen. Die Rückverfolgung einzelner Merbau-Stämme in der Handelskette wird bereits von dem Zertifizierungssystem CertiSource im Holzhandel in Australien praktiziert.

Inzwischen sind auch für andere Baumarten genetische Referenzdaten zur Holzherkunft erarbeitet worden. Die Anwendung und statistische Belastbarkeit von Gentests bei Holz zur Herkunftskontrolle ist international anerkannt. So konnten die Ergebnisse zu Gentests bei Mahagoni zur Kontrolle des Herkunftslandes und die Arbeiten zu Gentests bei der Kontrolle der Ursprungskonzession von Sapeli in Kamerun in hochrangigen forensischen Fachzeitschriften publiziert werden (Jolivet & Degen 2012, Degen et al. 2013).

4 Zusammenfassung

Merbau (*Intsia sp.*) ist ein wichtiges Tropenholz in Süd-Ost-Asien, das weltweit wegen seiner hohen Dauerhaftigkeit insbesondere für die Verwendung als Paketholz und im Außenbereich sehr nachgefragt wird. Jährlich werden ca. 1,5 bis 2,5 Millionen m³ Merbau-Holz eingeschlagen. Die wichtigsten Erzeugerländer sind Indonesien, Papua Neu Guinea und Malaysia. Ein bedeutender Anteil von Merbau wird illegal eingeschlagen. Brennpunkte des illegalen Holzeinschlages sind die indonesischen Provinzen Papua und Kalimantan, der Staat Papua Neu Guinea, sowie Sarawak und Sabah in Malaysia.

Ziel des Projektes war es, für die drei Merbau Arten *Intsia palembanica*, *Intsia bijuga* und *Intsia moeleri* eine genetische Referenzdatenbank aufzubauen, die für Gentest an Holz genutzt werden kann, um die Angaben zur geographischen Herkunft des Holzes zu überprüfen. Hierzu sollten über das gesamte Verbreitungsgebiet von Merbau verteilt Stichproben in Populationen gesammelt werden und dann an Kernmikrosatelliten (nSSRs) und neu zu entwickelnden Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) genetisch untersucht werden. Ferner sollten die Versuchsprotokolle zur DNA-Extraktion aus Merbau-Holz verbessert werden. Die Tauglichkeit der genetischen Referenzdatenbank und der Gentest am Holz von Merbau sollten in Praxistest mit Merbau-Holz deutscher, indonesischer und australischer Holzhändler überprüft werden. Das Projekt sollte sich zudem aktiv um den Aufbau eines Internationalen Netzwerkes zur Holzherkunftskontrolle bemühen.

An der Durchführung des Projekts waren neben der Universität Hamburg (Zentrum Holzwirtschaft, Arbeitsbereich Weltforstwirtschaft) hauptsächlich das Thünen-Institut für Forstgenetik, die Firma Plant Genetic Diagnostics GmbH und die in Singapur ansässige Firma DoubleHelix Tracking Technology beteiligt.

Es wurden im Projekt insgesamt 2707 Merbaubäume aus 51 Populationen beprobt. Bei den genetischen Inventuren mit 15 Kernmikrosatelliten hatte ein großer Teil der Proben ein ungewöhnliches Bandenmuster. Mit Hilfe von Untersuchungen zur Chromosomenzahl am Julius Kühn-Institut und mit Flowzytometer-Analysen am Thünen-Institut für Forstgenetik konnte geklärt werden, dass diese Merbau-Individuen einen mehr als doppelten Chromosomensatz hatten (Polyploidie). Der Standardfall für die Auswertung genetischer Daten an Kernmikrosatelliten ist der doppelte Chromosomensatz (Diploidie). Bei polyploiden Individuen ist die Datenauswertung auf Annahmen angewiesen und daher für ein möglichst gerichtsfestes Verfahren zum Herkunftsnachweis ungeeignet. Für 1119 diploide Individuen konnten die Genotypen an den 15 nSSRs dennoch bestimmt werden. Die Auswertung der Daten ergab insgesamt eine sehr ausgeprägte räumliche Strukturierung, wobei die Unterscheidung zwischen den Arten überraschenderweise keine wesentliche Rolle spielte. Es zeigte sich für *Intsia moeleri*, dass die beprobten Individuen aus Neukaledonien mit der Art *Intsia bijuga* identisch waren. Wir haben es also mit zwei Arten zu tun. Merbau aus Kambodscha unterschied sich genetisch deutlich von allen anderen Regionen. Im restlichen Verbreitungsgebiet teilten sich die Populationen in eine West-Gruppe (Sumatra und Sulawesi) und eine Ost-Gruppe (Java, Philippinen, Papua Inseln, Palau und Kalimantan). In Java und Kalimantan gehörten auch einige Individuen zu der West-Gruppe und andere zur Ost-Gruppe. Das bedeutet, dass die Merbau-Bäume in Java und Süd-Kalimantan einer Kontaktzone zwischen der West- und der Ost-Gruppe angehörten.

An 416 Individuen aus 41 Populationen haben wir für 11 Genmarker die Chloroplasten-Haplotypen bestimmt. Hierbei zeigte sich ein ausgeprägtes geographisches Muster. Ähnlich, wie bei den Kernmikrosatelliten, ließen sich die Populationen grob in eine West- und eine

Ost-Gruppe einteilen. Diese genetische West-Ost Trennung folgt den sehr bekannten Wallace- und Weber-Linien. Diese Linien stellen die Grenze zwischen asiatischer und australischer Fauna dar und sind das Ergebnis von Isolation aufgrund geänderter Land- und Wasserverteilung während der letzten Eiszeit.

An denselben 416 Individuen, die auch an den Chloroplasten-Genmarkern untersucht wurden, konnten wir schließlich die Genotypen an sechs neu entwickelten nSNP Genmarkern bestimmen. Der zusätzliche Einsatz dieser Genmarker ermöglichte es, die Merbau-Populationen von Papua und Papua Neu Guinea fast vollständig voneinander zu trennen.

Die Eignung der Genmarker bzw. Kombinationen der Genmarker für die Kontrolle der Holzherkunft beurteilten wir anhand der genetischen Differenzierung. Je stärker die genetischen Unterschiede bei einem Satz von Genmarkern zwischen verschiedenen Kollektiven sind, umso besser ist die Eignung für Herkunftskontrollen. Die stärkste genetische Differenzierung gemessen mit den Maßen d_{ST} und F_{ST} fand sich bei den Multilocus-Haplotypen der Chloroplasten Genmarkern, gefolgt von den Kern-Mikrosatelliten (nSSRs).

Für die Zuordnung von Individuen zu Populationen bzw. Regionen benutzten wir das Programm GeneClass2. Als Maß für die Zuverlässigkeit der Zuordnung und damit der Herkunftskontrolle berechneten wir den Prozentsatz der richtigen Fälle bei einer Selbstzuordnung. Auf der Ebene der Population lagen diese Werte zwischen 16% (nSNPs) und 62% (nSSRs). Bei höherer Aggregation der Referenzdaten zu Regionen lagen diese Werte zwischen 28 % (nSNPs) und 71 % (nSSRs). Die Selbstzuordnung von Gruppen von drei Individuen war deutlich sicherer. Hier lagen die Werte der richtigen Zuordnung zwischen 46 % (nSNPs) und 92 % (CP + nSNP). Bei noch höherer Aggregation der Referenzdaten (z.B. alle Populationen der Ost-Gruppe und alle Populationen der West-Gruppe) war auch die Zuordnung einzelner Individuen für die Chloroplasten-Genmarker in über 93% der Fälle richtig. Das sinnvolle Niveau der Aggregation hängt von der zu testenden Deklaration der Holzherkunft ab.

Im Rahmen des Projektes wurde die DNA-Extraktion von Merbau-Holzproben optimiert. Dafür wurde die Zusammensetzung des Extraktions-Puffers stärker darauf angepasst, Kohlenhydrate und Polyphenole abzutrennen. Ferner wurden die Reaktionszeiten für bestimmte Komponenten mit der Probe, z.B. die Inkubation der Probe im Extraktionspuffer, verlängert. Der Einsatz kommerziellen Kits für die abschließende Aufreinigung der DNA-Lösung steigerte die Qualität der DNA-Lösung noch mehr.

Wir führten anhand von 201 Holzproben einen Test durch, um die in diesem Projekt entwickelten Verfahren auf ihre Praxistauglichkeit zu überprüfen. Die Holzproben wurden dabei mit den Chloroplasten-Genmarkern auf ihre geographische Herkunft getestet. Für den Test nutzten wir Holzproben der deutschen Firma HARO und Merbau-Holzproben aus verschiedenen Forstkonzessionen und Sägewerken in Indonesien und aus dem Handel in Australien. Je nach Genmarker konnten wir am Holz für 15% bis 51% der Proben ein reproduzierbares Ergebnis liefern. Bei ca. 30 % der Proben war gar kein Genmarker erfolgreich, bei 30% der Proben funktionierten mehr als die Hälfte der Genmarker. Insgesamt wurde die Anwendungstauglichkeit der Methode gut bestätigt. Für das Material der Firma HARO konnten die Deklarationen zur Herkunft alle bestätigt werden, während bei einzelnen Proben, die aus dem Holzhandel in Australien stammten, Fehldeklarationen aufgezeigt wurden.

Gerade vor dem Hintergrund der kürzlich in Kraft getretenen EU Holzhandelsverordnung bietet die Merbau-Referenzdatenbank ein wichtiges Instrument für die Praxis zur Kontrolle der Holzherkunft.

5 Summary

Merbau (*Intsia sp.*) is an important tropical timber species from South-East Asia used for flooring and outdoor decking, which is very popular over the world for its high durability. Each year, about 1,5 to 2,5 Million m³ merbau timber is logged. The main producer countries are Indonesia, Papua New Guinea and Malaysia and a fair amount of timber is illegally logged. The Papua and Kalimantan provinces of Indonesia, Papua New Guinea, and Malaysian provinces of Sarawak and Sabah are the most affected by illegal logging activities.

The aims of the project were to set up a genetic reference database for the three merbau species *Intsia palembanica*, *Intsia bijuga* and *Intsia moeleri*, which would allow controlling the declaration of geographical origin through genetic testing on timber. To this end, we planned to sample merbau populations across its distribution range and to conduct genetic analysis at nuclear microsatellite markers (nSSRs) and at Single Nucleotide Polymorphism (SNP) that were to be developed in the frame of this project. Further, the DNA extraction protocols needed to be improved on merbau timber. Finally, we wanted to check the usability of the genetic database and the genetic analysis on merbau timber with a blind test including timber samples from German, Indonesian and Australian timber trade companies. Furthermore, in the frame of this project, active international networking activities considering identification of timber origin were to be encouraged.

Together with the university of Hamburg (Wood Science, World Forestry Department), the project mostly involved the Thünen-Institute of Forest Genetics, the German company Plant Genetic Diagnostics GmbH and DoubleHelix Tracking Technology located in Singapore.

A total of 2707 merbau trees were sampled from 51 populations. Analysis at 15 nSSRs loci showed unusual banding patterns in a lot of samples. Microscopic examination of chromosomes conducted at the Julius Kühn-Institute, together with flow-cytometry measurements clearly showed that these patterns were due to higher polyploidy levels in those merbau individuals. Because analysis of data from polyploidy individuals strongly relies on the assumptions, the use of such data as proof of origin in legal procedures is not appropriate. Still, 1119 diploid individuals could be genotyped at 15 nSSRs loci. Data analysis revealed a very strong geographical structuring, which surprisingly could not be explained by the presence of several species. The *Intsia moeleri* samples from New Caledonia were genetically similar to *Intsia bijuga* samples, suggesting that there are only two merbau species. Merbau from Cambodia was genetically very different to merbau from all other sampled regions. Across the other populations sampled, we defined two main groups: a Western lineage (Sumatra, Sulawesi) and an Eastern lineage (Java, Philippines, Papua Island, Palau and Kalimantan). In Java and Kalimantan, some individuals belonged to the Western lineage and others to the Eastern lineage. This suggests that merbau trees found in Java and South-Kalimantan are growing in a contact zone between the distribution areas of the Western and Eastern-lineages.

We further genotyped 416 individuals at 11 chloroplast markers, which exhibited a pronounced geographical pattern. Similar to data at nSSRs, a Western- and an Eastern-lineage could clearly be distinguished. This West-East pattern follows the well-known Wallace and

Weber-Lines. These Lines represent the separation between the Asiatic and Australian fauna, which probably resulted from isolation due to changing land and water distribution during the last ice ages.

The same 416 individuals (which were genotyped at chloroplast markers) were also genotyped at six newly developed nSNP markers. Combining these two sets of markers allowed merbau populations from Papua to be distinguished from Papua New Guinea. The use of molecular markers, or a combination of molecular markers, for the control of timber geographic origin strongly relies on the presence of genetic differentiation. Indeed, the suitability of a set of genetic markers to control geographic origin increases with genetic differentiation among populations. The chloroplast haplotypes showed higher genetic differentiation than the nSSRs, as indicated by the Δ and F_{st} estimates.

We used the software GeneClass2 to assign individuals to populations and regions, and therefore to control the origin. Reliability of this method was estimated as the percentage of individuals successfully assigned to their own group. At the population level, we observed rates of 16 % (nSNPs) to 62 % (nSSRs) correct assignment. When reference populations were grouped into regions, assignment success lay between 28 % (nSNPs) and 71 % (nSSRs). Assignment of groups of three individuals was much more reliable and estimated between 46 % (nSNPs) and 92 % (CP + nSNP). For higher levels of aggregation of the chloroplast data (e.g. all populations from the east-group and all populations from the west-group) even single individuals were in more than 93% of the cases correctly assigned to the true origin. The meaningful level of data aggregation depends on the declaration of origin of the tested timber.

In the frame of this project, DNA extraction was further optimised on merbau timber. The composition of the extraction buffer was adjusted to allow a better separation of carbohydrate and polyphenols. Further, duration of a few steps was increased, for example sample incubation time. Adding a purification step conducted with commercial kits also strongly increased DNA template quality.

To control the applicability of the methods developed in this project, we conducted a test on 201 timber samples. The samples were analysed at chloroplast markers and tested for their geographical origin. The timber samples were stemming from the firm HARO, from several forest concessions and sawmills in Indonesia and timber trade companies in Australia. According to the marker tested, we obtained repeatable results in 15% to 51 % of the samples. About 30 % of the samples failed completely and at least half of the genetic markers provided data in 30% of the samples. The applicability of the method could be confirmed in most cases. Declaration of origin from samples provided by the company Haro could be confirmed, while the claim of a few samples collected from timber trade companies in Australia was doubtful.

Given the entry into force of the new EU Timber Regulation, the merbau reference database provides a very important and ready-for-practice tool to control geographical origin.

6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Stichprobendesign

Bei der Konzeption des Projekts gingen wir davon aus, dass wir es mit drei genetisch klar unterscheidbaren Merbau Arten (*Intsia bijuga*, *Intsia palembanica* und *Intsia moleri*) zu tun haben. Entsprechend hatten wir das Stichprobendesign gestaltet. Für die beiden Arten mit großem Verbreitungsgebiet (*I. bijuga* und *I. palembanica*) sollten in jeweils 30 Populationen 50 verschiedene Individuen beprobt werden. So planten wir, insgesamt 3000 Individuen für die beiden Hauptarten und zusätzlich 100 Proben für *Intsia moleri* zu sammeln. Während des Projekts stellte sich heraus, dass die Art *Intsia moeleri*, die nur auf Neukaledonien vorkommen sollte, mit *Intsia bijuga* identisch ist. Ferner fanden wir an den untersuchten Genmarkern, ähnlich wie für die beiden Eichenarten *Quercus robur* und *Quercus petraea* in Europa (Petit et al. 2002), einen viel stärkeren Einfluss der geographischen Herkunft als der Artzugehörigkeit auf das genetische Muster der Referenzdaten. Für den Erfolg des Projektes war es daher wichtiger, eine möglichst gute räumliche Abdeckung zu bekommen, als für beide Arten 30 Populationen zu beproben. Schließlich kamen im Projekt 2707 Proben aus 51 Orten zusammen.

Ablauf der Stichprobennahme

Die Stichprobennahme war so geplant, dass ein kleinerer Teil der Proben direkt durch Personal des Projekts und der größte Teil durch Dritte im Rahmen von Werkverträgen eingesammelt werden sollte. Hierbei kam dem Projektpartner DHTT eine wichtige Rolle zu. Die Qualität der Proben, die in den ersten Monaten von DHTT aus Papua und PNG geschickt wurden, war unzureichend (starker Pilzbefall, unzureichende geographische Daten). Im Rahmen einer Dienstreise nach Papua konnte das Personal von DHTT geschult werden und die folgenden Probennahmen waren zufriedenstellend. Bei genetischen Inventuren von ca. 30% der Proben, die wir von einem Unterauftragnehmer bekommen hatten, stellte sich heraus, dass die Blätter bzw. das Kambium mehrerer vermeintlich unterschiedlicher Individuen genetisch identisch waren. Hier wurden also, entgegen der expliziten Versuchsanweisung, mehrere Blätter von denselben Individuen beprobt und dann als verschiedene Individuen deklariert. Diese mehrfach beprobten Individuen konnten wir in die weitere Analyse nicht einbeziehen. Wir hatten damit jedoch Zeit und Geld verloren. Ein Teil der Probennahme wurde daraufhin von anderen Teams wiederholt. Der Abschluss der verschiedenen Werkverträge hatte mehr Zeit in Anspruch genommen als geplant. In PNG ist eine politisch instabile Krisenregion. Viele beprobte Regionen waren nur mühsam zu erreichen. All dies führte dazu, dass wir für die Probennahme ca. 12 Monate mehr Zeit nötig hatten, als ursprünglich geplant.

Genmarker

nSSRs

Ursprünglich sollten im Projekt Kernmikrosatelliten (nSSRs) und Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) eingesetzt werden. Da ein großer Teil der Kernmikrosatelliten vor Beginn des Projekts bereits entwickelt war, hielten wir diesen Teil für einfach realisierbar. Es gelang insgesamt 15 nSSRs für die genetischen Inventuren zu optimieren. Jedoch zeigte sich, dass ein großer Teil der Merbau-Bäume polyploid war. Das bedeutet die Individuen haben einen mehr als doppelten Satz an Chromosomen. Die Bestimmung der Genotypen der Mikrosatelliten ist bei polyploiden Individuen nicht eindeutig und basiert auf Annahmen. So kann bei gemischterbigem (heterozygoten) Individuen nicht bestimmt werden, mit wie vielen Kopien die Allele im Genotypen vertreten sind. Neben diesem sehr schwerwiegenden Problem bei der Interpretation der Daten kam hinzu, dass die Kernmikrosatelliten schlecht

reproduzierbare Ergebnisse am Holz lieferten. Wir mussten uns daher auf die genetische Inventur der Mikrosatelliten der diploiden Individuen beschränken und hatten im Laufe des Projekts viel größeres Gewicht auf die Entwicklung möglichst vieler Chloroplasten-Genmarker gesetzt. Die genetische Information bei den Chloroplasten befindet sich außerhalb des Zellkerns und ist damit unabhängig vom Polyploidiegrad.

SNPs

Als wir das Projekt vor fünf Jahren konzipiert hatten, waren die Entwicklung und der Einsatz von Genmarkern zu Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) noch sehr neu. In den letzten Jahren haben sich mehrere alternative Ansätze zur Entwicklung der SNPs und auch mehrere Verfahren zur Genotypisierung der SNPs etabliert. Insgesamt benötigten wir im Projekt drei Anläufe, um die SNPs zu entwickeln und es gelang schließlich ein sehr zuverlässiges Verfahren zur Genotypisierung (SnapShot-Ansatz) zu etablieren. Unsere Hoffnung, dass die Kürze der DNA-Fragmente ein großer Vorteil bei der Bestimmung der SNP-Genotypen im Holz sind, haben sich insbesondere bei SNPs, die im Chloroplasten liegen, bestätigt. Die Schwierigkeiten bei der Entwicklung der SNPs war auch ein Grund für die notwendige längere Laufzeit des Projekts.

Weiterführende Fragestellungen und Arbeiten

Eine genetische Referenzdatenbank für die Holzherkunftskontrolle ist nichts Statisches. Mit zusätzlichen Referenzproben und zusätzlichen Genmarkern kann die Präzision weiter gesteigert werden. So können wir z.B. mit den aktuellen Daten relativ effektiv Merbau-Holz von Papua und PNG unterscheiden. Wir haben jedoch bereits Anfragen bekommen, ob wir innerhalb von Papua die Regionen kleinräumiger differenzieren können. Hierfür wären weitere Stichproben und ggf. noch mehr SNP-Genmarker erforderlich. Es sind also kontinuierliche Investitionen sinnvoll, um die erarbeiteten genetischen Referenzdaten auf dem aktuellen Stand zu halten und an konkrete Prüfschwerpunkte anzupassen.

7 Literaturverzeichnis

- BONER M., SOMMER TH., ERVEN C. and FÖRSTEL H. (2008): Stable isotopes as a tool to trace back the origin of wood. *vTI Agriculture and Forestry Research* 321: 47-57
- CAO C.P., FINKELDEY R., SIREGAR I.Z., SIREGAR U.J. and GAILING O. (2006): Genetic diversity within and among populations of *Shorea leprosula* Miq. and *Shorea parvifolia* Dyer (Dipterocarpaceae) in Indonesia detected by AFLPs. *Tree Genetics & Genomes* 2: 225-239.
- CAVERS S., NAVARRO C. and LOWE A.J., (2004): Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case study of *Cedrela odorata* L. *Forest Ecology and Management* 197: 285-294.
- CHEUNG S.P., CHUNG T., and STARK T. (2007): Merbau's last stand – How industrial logging is driving the destruction of Paradise Forests of Asia Pacific. Greenpeace International, Amsterdam.
- CULLINGS, K. W., (1992): Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1.
- DEGEN B. (2008) Proceedings of the international workshop “Fingerprinting methods for the identification of timber origins. *vTI Agriculture and Forestry Research*, special issue 321.
- DEGEN B., WARD S.E., LEMES M.R., NAVARRO C., CAVERS S., SEBBENN A.M. (2013). Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints. *Forensic Science International Genetics*, 7, 55-62.
- DEGUILLOUX M. F., PEMONGE M.H. and PETIT R.J. (2002): Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proc R Soc Lond B* 269: 1039-1046.
- DOYLE, J.J. and J.L. DOYLE. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- FOREST TREND (2006): Logging, legality, and livelihoods in Papua New Guinea: Synthesis of official assessments of the large-scale logging industry (www.forest-trends.org/documents/png/index.php)
- FUJII T. (2007): Proceedings of the international Symposium on development of improved methods to identify shorea species wood and its origin. <http://www.ffpri.affrc.go.jp/symposium/symp070925/intsympo070925-e.html>
- GOUDET J. (1995): FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- GREGORIUS H.R. (1974): Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. zur Konzeption der Abstandsmessung. *Silvae Genetica* 23:22–27.
- GREGORIUS H.-R., DEGEN B. and KÖNIG A. (2007): Problems in the analysis of genetic differentiation among populations – a case study in *Quercus robur*. *Silvae Genetica* 56, (3-4): 190-199.
- GREGORIUS H.-R. (1996) Differentiation between populations and its measurement. *Acta Biotheoretica* 44:23-36.
- HAMMER O, HARPER DAT (2006). *Paleontological Data Analysis*. Oxford: Blackwell Science Publ.
- HEDRICK PW. (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633-1638.
- HÖLTKEN A.M., SCHRÖDER H., WISCHNEWSKI N., DEGEN B., MAGEL E. und FLADUNG M. (2012) Development of DNA-based methods to identify CITES-protected species: A case study in the Meliaceae family. *Holzforschung* 66, 97-104.

- HONJO M., UENO S., TSURNURA Y., HANDA T., WASHITANI I. and OHSAWA R. (2008): Tracing the origins of stocks of the endangered species *Primula sieboldii* using nuclear microsatellites and chloroplast DNA. *Conservation Genetics* 9: 1139-1147.
- INDRIOKO S., GAILING O. and FINKELDEY R. (2006): Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Indonesia based on chloroplast DNA. *Plant Systematics and Evolution* 261: 99-115.
- Jolivet C., Degen B. (2012). Use of DNA fingerprints to control the origin of sapelli timber (*Entandrophragma cylindricum*) at the forest concession level in Cameroon. *Forensic Science International Genetics*, 6, 487-493.
- LEMES M.R., GRIBEL R., PROCTOR J. and GRATTAPAGLIA D. (2003): Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology* 12: 2875-2883.
- NARUM S.R., BANKS M., BEACHAM T.D., BELLINGER M.R., CAMPBELL M.R., DEKONING J., ELZ A., GUTHRIE C.M., KOZFKAY C., MILLER K.M., MORAN P., PHILLIPS R., SEEB L.W., SMITH C.T., WARHEIT K., YOUNG S.F. and GARZA J.C. (2008): Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology* 17: 3464-3477.
- NOVICK R.R., DICK C.W., LEMES M.R., NAVARRO C., CACCONE A. and BERMINGHAM E. (2003): Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 2885-2893.
- PETIT RJ, ET AL. (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 176:595-599.
- PIRY S., ALAPETITE A., CORNUET J.-M., PAETKAU D., BAUDOIN L. and ESTOUP A. (2004): GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95: 536-539.
- PRITCHARD J.K., STEPHENS M. and DONNELLY P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RACHMAYANTI Y., LEINEMANN L., GAILING O. and FINKELDEY R. (2006): Extraction, amplification and characterization of wood DNA from Dipterocarpaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 45-55.
- RANNALA B., MOUNTAIN J.L. (1997): Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94: 9197-9221.
- SHAW J., LICKY E.B, BECK J.T., FARMER S.B., LIU W., MILLER J., SIRIPUN K.C, WINDER C.T., SCHILLING E.E and SMALL R.L. (2005). The tortoise and the Hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- SMULDERS, M. J. M., VAN'T WESTENDE, W. P. C., DIWAY, B., ESSELINK, G. D., VAN DER MEER, P. J. and KOOPMAN, W. J. M., (2008): Development of microsatellite markers in *Gonystylus bancanus* (Ramin) useful for tracing and tracking of wood of this protected species. *Molecular Ecology Resources* 8: 168-171.
- SOERIANEGARA I. and LEMMENS R.H.M.J. (1998): Timber trees: Major commercial timbers *Plant Resources of South-East Asia* 5. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen.
- SWOFFORD D.L. (2003): PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G. and BOUVET J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- VAY O. (2008): Molekulargenetische Identifikation von CITES Holzarten und deren Substitutionshölzer. Diplomarbeit an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg
- VALLONE PM., JUST R. S, COBLE M. D., BUTLER J. M. AND PARSONS T. J. (2004). A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med.* 118: 147–157
- WEISING K., GARDNER R.C (1999): A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- WONG K.N., TAN W.L., CHEW F.T. (2008): Identification and characterisation of microsatellite loci in *Intsia palembanica* (Leguminosae), a valuable tropical timber species, *Molecular Ecology Resources*, in press
- YOUNG K.R. (2003): Genes and biogeographers: Incorporating a genetic perspective into biogeographical research. *Physical Geography* 24: 447-466.